Latin American Journal of Aquatic Research

formerly *Investigaciones Marinas*

www.lajar.cl · www.scielo.cl
ISSN 0718 - 560X

VOLUME 43(3) JULY 2015

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO - ESCUELA DE CIENCIAS DEL MAR - CHILE

Latin American Journal of Aquatic Research

www.lajar.cl ISSN 0718 -560X www.scielo.cl

Financiamiento parcial de CONICYT obtenido en el Concurso
"Fondo de Publicación de Revistas Científicas año 2015"

Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Casilla 1020, Valparaíso, Chile - Fax: 56-32-2274206, E-mail: lajar@ucv.cl

LATIN AMERICAN JOURNAL OF AQUATIC RESEARCH
Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3) 2015

CONTENTS

Short Communications

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 388-401, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-1

Review

Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas

Ljubomir Papić[1], Katherine García[2] & Jaime Romero[2]
[1]Doctorado en Acuicultura, Programa Cooperativo Universidad de Chile
Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile
[2]Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile
Avda. El Líbano 5524, Santiago, Chile
Corresponding autor: Jaime Romero (jromero@inta.cl)

RESUMEN. El desarrollo de la acuicultura sustentable es acorde con la demanda creciente de nuevas metodologías que aseguren la salud de las diversas especies acuícolas. Dentro de ellas, el uso de terapias revolucionarias basadas en RNA de doble cadena (dsRNA) ha abierto una amplia gama de posibilidades en el progreso de las estrategias de control y prevención de enfermedades. El sistema de silenciamiento génico mediante RNA de interferencia (RNAi) presenta un interesante potencial para el control de enfermedades infecciosas en sistemas de acuicultura. Por otro lado, se ha visto que los dsRNA pueden tener un importante efecto inmunomodulador en células de peces activando mecanismos de defensa inmune innata. La definición de un adecuado sistema de suministro para asegurar el ingreso de los dsRNA a la célula objetivo ha resultado en pruebas medianamente exitosas. Sin embargo, el cómo suministrar el dsRNA para asegurar el ingreso al organismo en su hábitat natural, se presenta como la principal dificultad de esta tecnología. Este trabajo presenta una completa revisión del potencial del silenciamiento post-transcripcional mediado por dsRNA, como estrategia antiviral en peces de cultivo y de su potencial uso como inmunoestimulante, enfatizando la necesidad de buscar metodologías que permitan suministrar el dsRNA al organismo objetivo, considerando las limitaciones y particularidades de un sistema de cultivo intensivo.

Palabras clave: RNA de doble cadena, RNA de interferencia, inmunoestimulante, antiviral, respuesta interferón, acuicultura.

Progress and limitations of dsRNA strategies in the control of viral diseases in aquaculture

ABSTRACT. The development of a sustainable aquaculture is consistent with a growing demand for new methods to ensure the health of various aquatic species. Among them, the use of revolutionary therapies based on double-stranded RNA (dsRNA) has opened a wide range of possibilities in the progress of the control strategies and disease prevention. The system of gene silencing by RNA interference (RNAi) has an interesting potential for the control of infectious diseases in aquaculture systems. On the other side, it has been found that dsRNA can have a significant immunomodulatory effect in fish cells, activating innate immune defense mechanisms. The definition of a suitable delivery system to ensure the entry of dsRNA to the target cell has results in moderately successful assays. However, the delivery of dsRNA to ensure the entry to the organism in its natural habitat is the main difficulty of this technology. This work presents a comprehensive review of potential post-transcriptional silencing by dsRNA as antiviral strategy in fish farming and its potential use as an immunostimulant, emphasizing the need to seek methodologies to deliver dsRNA into the target organism, considering the limitations and characteristics of a system of intensive farming.

Keywords: double stranded-RNA, RNA interference, immunostimulant, antiviral, interferon response, aquaculture.

Corresponding editor: Patricio Arana

INTRODUCCIÓN

La acuicultura se ha convertido en un dinámico sector productivo en los últimos años, y es responsable de satisfacer en gran parte la demanda mundial por alimentación (Plant & LaPatra, 2011; FAO 2012). En el 2011, la actividad pesquera y la acuicultura produjeron aproximadamente 154 millones de toneladas de peces a nivel mundial, de los cuales 131 millones se destinaron a alimentación (FAO, 2012). En este escenario, resulta indispensable abordar cualquier problema que pueda amenazar esta actividad. Las enfermedades de los organismos cultivados resulta ser uno de los principales inconvenientes (Plant & LaPatra, 2011). A la fecha, existen varios compuestos antibióticos y antipara-sitarios, que se utilizan para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias y parásitos, sin embargo, tratamientos efectivos contra virus no se encuentran fácilmente (Plant & LaPatra, 2011). Distintos tipos de virus amenazan a la acuicultura, entre ellos, en la industria de salmónidos destacan el virus que provoca la anemia infecciosa del salmón (ISAV, del inglés infectious salmon anemia virus) (Nylund *et al.*, 2007), el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV, del inglés infectious pancreatic necrosis virus) (Guy *et al.*, 2006), el virus de la necrosis hemato-poyética infecciosa (IHNV, del inglés infectious hematopoietic necrosis virus) (Thoulouze *et al.*, 2004), el virus de la septicemia hemorrágica (VHSV, del inglés viral hemorrhagic septicemia virus) (Kim *et al.*, 2012), o en la industria del camarón, el virus que genera el síndrome de la mancha blanca (WSSV, del inglés white sport síndrome virus) (Sarathi *et al.*, 2008). Para controlar esta amenaza, en la actualidad se trabaja con ayuda de la biotecnología y herramientas de ingeniería genética para desarrollar estrategias y terapias que permitan abordar este problema.

Una de estas tecnologías que concita mayor interés últimamente, es la del RNA de interferencia (RNAi) (Lima *et al.*, 2013). El RNAi es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional descubierto en la última década, donde el RNA de doble cadena (dsRNA) proveniente de una región codificante o un gen, es introducido a un organismo, resultando en la degradación específica de un mRNA complementario al interior de la célula (Provost *et al.*, 2002). Este silenciamiento post-transcripcional se encuentra bien conservado evolutivamente en varios organismos eucariontes, permitiendo proteger a la célula contra virus a través de un ataque altamente específico, basado en la generación de cadenas pequeñas de RNAs interferentes de 21 a 28 nucleótidos (Shuey *et al.*, 2002; Almeida & Allshire, 2005; Aagard & Rossi, 2007).

Por otro lado, también se ha puesto atención en el posible efecto inmunomodulador que podrían tener los dsRNA utilizados como adyuvantes en vacunas para inducir la estimulación del sistema inmune innato (Ruyra *et al.*, 2013; Thim *et al.*, 2014). Los adyuvantes mejoran la respuesta humoral y celular (Ruyra *et al.*, 2013), siendo los dsRNA un candidato para potenciar este proceso. En este contexto, los dsRNA representan una novedosa alternativa enfocada a mejorar la salud de los peces.

En esta revisión se abordan los mecanismos de acción del dsRNA y sus posibles aplicaciones como terapia antiviral y/o inmunomodulador en acuicultura, con especial énfasis en las dificultades de suministro que deben ser superadas para asegurar la presencia del dsRNA en la célula del organismo blanco.

dsRNA como sustrato de la vía de RNA interferencia

En los organismos eucariontes, la exposición intra-celular a una secuencia de dsRNA desencadena un proceso de silenciamiento post-transcripcional secuencia-específico en un mRNA homólogo. La ruta del RNAi se inicia con el ingreso de un dsRNA activador de cadena larga al interior de la célula, que rápidamente se corta en pequeños trozos de 21 a 28 pares de bases mediante la acción de la enzima Dicer (ribonucleasa III) que tiene la particularidad de reconocer y cortar el dsRNA en lugares específicos (Provost *et al.*, 2002; Shuey *et al.*, 2002; Aagard & Rossi, 2007). Estos pequeños trozos de dsRNA se denominan RNAi pequeños, o siRNA por su acrónimo en inglés small interference *RNA*. Esta enzima posee un dominio helicasa, sugiriendo la necesidad de que el dsRNA activador deba desen-redarse antes del ataque enzimático (Shuey *et al.*, 2002). Los siRNA son incorporados a un complejo de silenciamiento de RNA llamado RISC. (del acrónimo en inglés multi-subunit RNA-induced silencing complex), donde la proteína argonauta (Ago) es uno de los principales componentes (Zamore *et al.*, 2000). Esta hidrólisis del mRNA ocurre entre las regiones homólogas del siRNA, permitiendo una selectividad a la hora de hidrolizar (Fig. 1) (Shuey *et al.*, 2002). La eficiencia del proceso de hidrólisis del mRNA no está aún bien descrita, sin embargo, entre las que se describen como variables son el tamaño del siRNA, y la estructura secundaria del mRNA y en consecuencia, la accesibilidad para la operación del complejo RISC (Aigner, 2006).

Producción de dsRNA

Para producir dsRNA *in vitro*, básicamente existen tres estrategias: síntesis química, síntesis enzimática *in vitro* y vectores de DNA plasmidial. Cada uno de estos mé-todos posee diversas ventajas y desventajas (La Fauce & Owens, 2012).

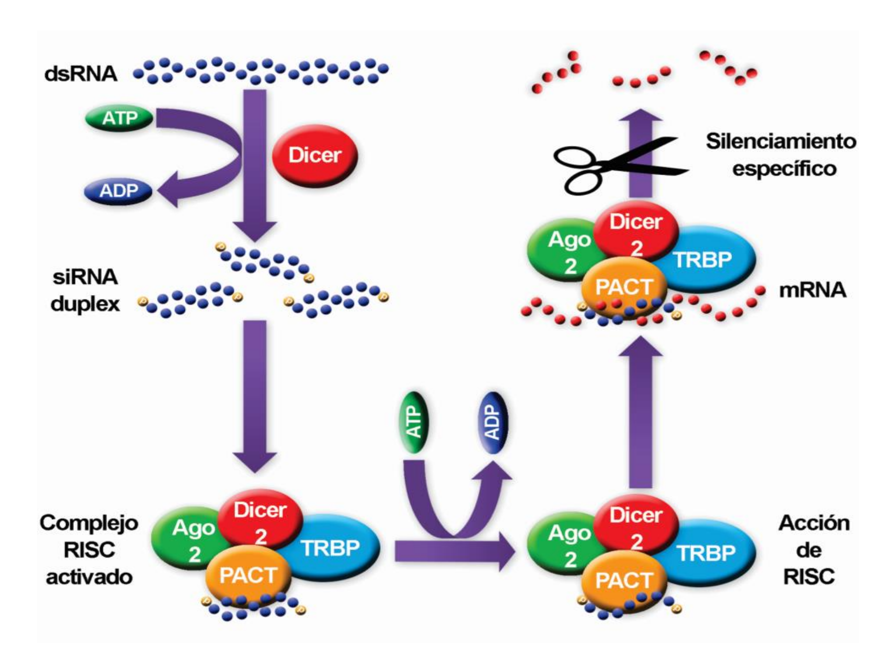


Figura 1. Modelo simplificado del sistema de silenciamiento génico con RNAi a partir de un dsRNA que ingresa a la célula, resultando en la hidrólisis del mRNA objetivo. El dsRNA se muestra al inicio como círculos pequeños de color azul entrelazados, simulando una doble hebra. Este dsRNA es reconocido por Dicer, la cual procesa esta molécula generando pequeños RNAs de doble cadena (small inteference RNA duplex o siRNA duplex). Posteriormente, estos siRNA duplex son reconocidos por el complejo RISC (multi-subunit RNA-induced silencing complex) activado, compuesto por varias proteínas (Ago2, Dicer 2, PACT, TRBP), el cual denatura la doble cadena del siRNA y degrada una de las hebras, dejando la otra unida al complejo (ver en figura acción de RISC). Si la hebra que queda unida a RISC es complementaria a un RNA mensajero (mRNA, círculos pequeños rojos que simulan una hebra simple), se produce la hibridación de ambas hebras por complementariedad de bases y, en consecuencia el complejo RISC procede a la degradación del mRNA, generando un silenciamiento específico de la expresión del gen.

Los dsRNAs que se sintetizan en forma química son introducidos directamente en el citoplasma de la célula evitando el paso por la enzima Dicer. Debido a su tamaño se les denomina siRNAs. Estos siRNAs pueden ser sintetizados en grandes cantidades y se ha probado que son más eficientes en gatillar una degradación del mRNA secuencia-específica. Sus principales desventajas son el alto costo económico y tiempo de síntesis lo que no lo hace factible para producciones a gran escala, más aún si múltiples siRNAs están involucrados (Duxbury & Whang, 2004).

Los dsRNAs generados enzimáticamente involucran una transcripción *in vitro* mediada por la polimerasa del fago T7 (Donze & Picard, 2002). Como producto de la transcripción se obtienen pequeños RNAs repetidos invertidos que se denominan *small hairpin* RNAs (shRNAs), que son subsecuentemente cortados por Dicer. Es el método más rápido y más rentable para la síntesis de siRNA. Sin embargo la pureza y especificidad usando este tipo de síntesis es variable y se puede obtener resultados de una inhibición no específica en la expresión génica (Duxbury & Whang, 2004).

El uso de vectores como los plásmidos de DNA que poseen el promotor de la polimerasa III, también pueden ser utilizados para generar dsRNAs para silenciamiento génico (Sui *et al.*, 2002). Los dsRNAs son producidos y subsecuentemente procesados por Dicer en siRNAs. El uso de estos plásmidos que generan dsRNAs, permite su expresión estable por al menos 2 meses post-transfección y es más económico al generar múltiples secuencias que son obtenidas por la propia maquinaria de RNAi, sin requerir de un procesamiento externo que aumente los costos de producción. Su principal desventaja es que el éxito es dependiente del proceso de transfección (Duxbury & Whang, 2004).

Otra de las estrategias utilizadas es generar dsRNAs utilizando sistemas *in vivo*. En este caso el uso de bacterias recombinantes, resulta una buena opción como sistemas de producción, debido a su fácil manipulación, rápido crecimiento en medios de cultivos adecuados y capacidad de contener plásmidos en su interior (Timmons & Fire, 2001; Terpe, 2006; Solís *et al.*, 2009; Posiri *et al.*, 2013). En el caso de *Escherichia coli*, además de estas características, se

utiliza una cepa que posea una mutación en el gen que codifica para RNasa III para evitar la hidrólisis enzimática del material genético acumulado. La cepa más utilizada es la *E. coli* HT115 (DE3), ya que posee características idóneas para ocuparlas como máquinas productoras de dsRNA, además de expresar una RNA T7 polimerasa que permite expresar RNAs a partir de plásmidos que poseen doble promotor T7 (Fig. 2) (Timmons & Fire, 2001; Sarathi *et al.*, 2008; Posiri *et al.*, 2013). De manera general, luego de la construcción del plásmido recombinante, como el pL4440 (Timmons & Fire, 1998), la bacteria productora se transforma mediante shock térmico, electroporación o mediante el uso de químicos. Posteriormente, mediante técnicas de cultivo, *E. coli* HT115 crece exponencialmente hasta que se induce la expresión de la RNA T7 polimerasa (que se encuentra bajo el control de un promotor inducible) con isopropil-1,1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) o lactosa, para iniciar la producción de dsRNA (Fig. 2) (Sarathi *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2009).

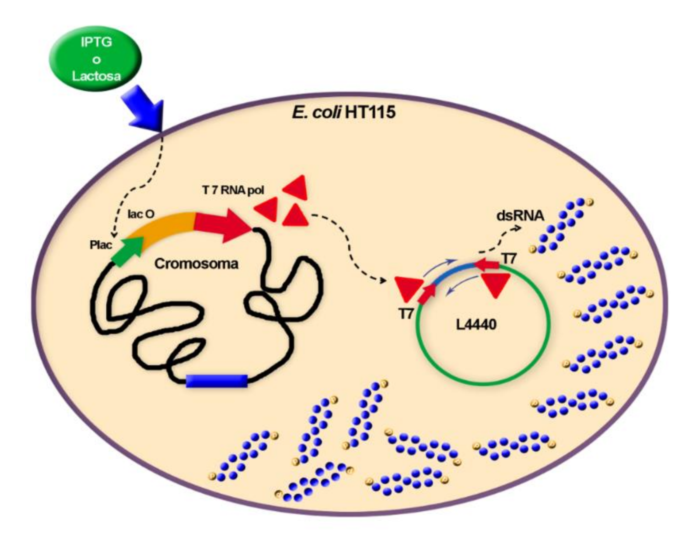


Figura 2. Esquema general de la producción del dsRNA en la bacteria *E. coli* HT115. La expresión de la RNA polimerasa T7 (triángulos rojos), codificada en el cromosoma de *E. coli* HT115 bajo el control del operon *lac*, es inducida por la adición de IPTG o lactosa (círculo verde ubicado al exterior de la bacteria que es representada como el óvalo azul). La RNA polimerasa reconoce ambos promotores T7 presentes en el plásmido L4440 (círculo verde), que están orientados en forma inversa, y procede a la síntesis de los RNA de doble cadena (pequeñas hebras representadas por círculos azules entrelazados que simulan una doble cadena), los cuales mediarán el proceso de interferencia.

Cada uno de los métodos descritos posee una serie de ventajas y desventajas, sin embargo, pensando en una producción a gran escala como la que se necesitaría en sistemas de cultivo acuícola intensivos, la estrategia que utiliza sistemas *in vivo* representa la opción más fácil, rápida y económicamente viable de producir los dsRNA.

RNAi como una estrategia promisoria en el control *in vitro* de enfermedades virales que afectan a la acuicultura

El RNA interferente es una estrategia que se ha utilizado ampliamente para entender la función de los genes y es una metodología promisoria para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y antivirales (Gavrilov & Saltzman, 2012). Dentro de ellas se ha sugerido el desarrollo de terapias orientadas al tratamiento de enfermedades virales y parásitos en organismos acuáticos (Lima *et al.*, 2013). A la fecha se han obtenido reportes exitosos que han utilizado el RNAi contra el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Sarathi *et al.*, 2008). Esta enfermedad es responsable de pérdidas económicas severas en la industria del camarón a nivel mundial, causando 100% de mortalidad en cultivos de camarón entre 3-4 días (Lightner, 1996). El WSSV posee un gen, VP28, el cual codifica para una de las proteínas estructurales del virus y está involucrado en la adhesión y penetración en las células de camarón. En los estudios de Sarathi y sus colaboradores (Sarathi *et al.*, 2008), este gen fue utilizado como blanco del dsRNA antiviral sintetizado por bacterias *E. coli* HT115 (DE3). Experimentos con microscopia de fluorescencia y ELISA mostraron que VP28dsRNA fue capaz de silenciar la expresión del gen VP28, previamente clonado en un plásmido eucarionte y transfectado en la línea celular SISK, una línea celular continua derivada de riñón de lubina.

De igual forma, otros estudios llevados a cabo *in vitro* (Ruiz *et al.*, 2009; Kim & Kim, 2011; Kim *et al.*, 2012) han sugerido que sería posible controlar otra enfermedad, la septicemia hemorrágica viral, combatiendo su agente causal, el virus VHSH mediante el uso de RNAi. Este virus, posee un genoma RNA de simple hebra de polaridad negativa y pertenece a la familia *Rhabdoviridae* y es el causante de una de las enfermedades virales más importantes que se produce en una amplia variedad de especies de peces silvestres y de cultivo a nivel mundial. Kim *et al.* (2012) utilizaron un vector con doble promotor U6 de fugu, el cual genera una producción continua de dsRNAs largos en células EPC, una línea celular de epitelioma derivado de carpa, previamente transfectadas. Los dsRNA que utilizan como blanco el gen G de VHSV, el cual codifica para glicoproteína, suprimen la expresión de este gen. Al impedirse la producción de glicoproteína se obtienen partículas virales incompletas, y en consecuencia, se inhibe la proliferación de VHSV en cultivo de EPC. Esta supresión depende exclusivamente de la maquinaria de interferencia, ya que los RNAi no afectan la expresión de genes relacionados con la

activación de la vía de interferón, es decir, su acción ocurre por el apagamiento de la expresión génica del gen G y no por efectos secundarios inespecíficos del dsRNA. Además esta protección es secuencia específica, ya que solo se inhibe la infección con VHSV pero no de otros virus como el IHNV en cultivo celular. Este estudio demostró que dsRNA largos median el mecanismo de interferencia en células de peces, y podrían ser utilizados para el análisis de la función génica en células de peces además de ser aplicados como estrategia antiviral (Kim *et al.*, 2012).

Los últimos estudios han mostrado también la factibilidad de utilizar dsRNA para inhibir *in vitro* la replicación viral del Ciprinido herpes virus-3, CyHV-3 (Gotesman *et al.*, 2013). CyHV-3 es el agente etiológico del herpesvirus, que causa altas mortalidades (tasa de 80-100%) y afecta a la carpa común y carpa koi (*Cyprinus carpio L.*) (Hedrick *et al*., 2000; Ilouze *et al*., 2006). Esta enfermedad ha sido listada como notificable en Alemania desde 2005 y por la Organización Mundial de la Salud Animal desde 2007 (Gotesman *et al*., 2013). En este estudio, se analizó la posibilidad de activar la vía de RNAi utilizando pequeños RNAs interferentes (siRNAs) para probar la inhibición viral *in vitro* de CyHV-3 en células de cerebro de carpa común (línea celular common carp brain, CCB). Los siRNAs fueron diseñados contra los genes timidina quinasa (*tk*) y DNA polimerasa (*dp*), que codifican para transcritos involucrados en la replicación. La inhibición de la replicación viral se midió por qPCR siguiendo la detección del gen reportero ORF81. El tratamiento de siRNA contra *tk* o *dp* permitió la reducción en la liberación de partículas virales desde células CCB infectadas *in vitro* con CyHV-3. El tratamiento más efectivo se obtuvo al silenciar el gen DP de acuerdo a la medición de ORF81 por qPCR. Este ensayo preliminar estableció las bases para el uso de RNAi para el control de CyHV-3 (Gotesman *et al.*, 2013). Recientemente, nuestro grupo ha probado con éxito la efectividad de esta estrategia contra ISAv (García *et al.*, 2015).

RNAi como terapia antiviral *in vivo* en peces

Diversos organismos eucariontes presentan variados mecanismos de defensa como una protección natural frente a infecciones virales, lo que les permite detectar y combatir a estos patógenos. El dsRNA presente en el genoma del virus, o generado durante la replicación, es reconocido por el organismo hospedero como un patrón inequívoco de la infección viral, generando una variada respuesta inmune (Lima *et al.*, 2013). En los últimos años se han publicado trabajos que dan cuenta de una efectiva estrategia contra infecciones virales utilizando dsRNA exógenos en distintos organismos; en vegetales frente a tobamovirus y potivirus (Tenllado *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2009), mamíferos desafiados con virus de hepatitis B y C (Aagard & Rossi, 2007), crustáceos infectados con el virus de la cabeza amarilla (Posiri *et al.*, 2013) o con el virus de la mancha blanca (Sarathi *et al.*, 2008, 2010) y peces frente al virus hemorrágico de la carpa, virus de la necrosis nerviosa, iridovirus, virus de la septicemia hemorrágica viral (Kim *et al.*, 2012), entre otros (Schyth *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2013).

Los problemas por enfermedades virales en peces pueden ser una dificultad en bancos naturales de este recurso, pero pueden tener un devastador efecto en sistemas de acuicultura. Un claro ejemplo de esto es lo ocurrido con la industria del salmón en Chile durante 2008 y 2009 con el brote de virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) (Mardones *et al.*, 2011). Si bien los estudios de la actividad antiviral del RNAi en peces, principalmente han aportado una abundante evidencia en líneas celulares *in vitro* (Tabla 1), es necesario realizar más ensayos de campo con peces sometidos a condiciones reales de cultivo.

Como se detalla anteriormente, en los estudios realizados *in vitro*, se ha sugerido la existencia de la maquinaria que posibilita el silenciamiento génico mediante RNAi y por tanto, su potencial antiviral. En desafíos de *Gobiocypris rarus* frente a reovirus de carpa hervíbora (GCV, grass carp reovirus), se ha observado por RT-PCR cuantitativo en tiempo real que el nivel de transcrito de Dicer incrementa significativamente en el periodo temprano de la infección viral y disminuye desde las 24 h post-infección (hpi). El mRNA de Dicer vuelve a los niveles de expresión del control a las 48 hpi. Al observar por microscopía electrónica de transmisión, los viriones fueron difícilmente observados a las 12 hpi, pero se observaron partículas virales desde las 24 hpi. Estos resultados sugieren que la vía de RNAi es activada en estados tempranos de la infección (Su *et al.*, 2009). Por otro lado, el *knockdown* de Dicer-1 en *Penaeus monodon* resulta en mortalidades incrementadas y elevados títulos virales, sugiriendo que el mecanismo de RNAi se encuentra activo (Kitagishi *et al.*, 2011). Los altos niveles de expresión de Dicer en órganos linfoides son consistentes con un rol en la respuesta de defensa del camarón. En el caso de *Litopenaeus vannamei*, se conoce que Dicer-2 está involucrada en la inmunidad antiviral no específica y en algún grado soporta la relación sugerida entre activación de la inmunidad antiviral y la inducción de RNAi. Se ha propuesto que Dicer-2 podría contribuir a la activación de la inmunidad antiviral no específica aumentando la potencia y eficacia del RNAi (Kim *et al.*, 2005). Sin embargo, se requiere más estudios que permitan identificar los componentes de la vía de RNAi en cama-

Tabla 1. Algunos estudios de aplicación de RNAi como terapia antiviral en acuicultura.

Célula u organismo	Gen objetivo	Método de suministro	Virus	Resultado principal	Referencia
Embriones de trucha arcoíris	*GFP*	Micro- inyección	_	siRNAs suprimen efectivamente la expresión transiente de GFP localizado episomalmente, en un estado de desarrollo temprano y en embriones de truchas transgénicas	Bonanuntanasarn *et al.* (2003)
Células musculares de *Pimephales promelas*	*Proteína de cápside*	Transfección	Iridovirus tiger frog virus	Silenciamiento específico del gen reportero lacZ en células FHM por expresión de shRNAs desde plásmidos o por siRNAs transfectados. Silenciamiento de proteína mayor de cápside e inhibición de la replicación viral en células HeLa con siRNAs específicos	Xie *et al.* (2005)
Embriones de salmón chinnook	*Nucleoproteína-N*	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	27-25 mer dsiRNAs. Reducen el nivel de expresión génica viral y la replicación viral en forma específica en cultivo celular *in vitro*	Bohle *et al.* (2011)
Células de epitelioma de carpa	*L-polimerasa*	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Varias secuencias siRNA. Interferencia no específica para la infección con el virus VHSV. Interferencia similar para la infección con un rabdovirus heterólogo	Ruiz *et al.* (2009)
Células de epitelioma de carpa	*Glicoproteína*	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Transfección con tres siRNAs diferentes específicos contra el gen de la glicoproteína viral, inhibe eficientemente la multiplicación viral en cultivos celulares infectados	Schyth *et al.* (2006)
Células de epitelioma de carpa	*Glicoproteína*	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Vector produce shRNAs. Apagamiento de la expresión del mRNA del gen G en forma secuencia específica en cultivos de células EPC. Supresión de la replicación viral específica dependiente de RNAi	Kim & Kim (2011)
Células de epitelioma EPC y células CHSE-214	*Glicoproteína*	Transfección	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	dsRNAs largos contra el gen G de VHSV suprimen efectivamente la expresión de su gen blanco, mientras que los dsRNAs controles no tienen efecto	Kim *et al.* (2012)
Juveniles de trucha arcoíris	*Glicoproteína*	Inyección intraperitoneal	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Disminución de la mortalidad de los peces desafiados con el virus. La protección no dependió de los siRNA, más bien fue dependiente de respuesta interferón	Schyth *et al.* (2007)
Trucha arcoíris	*Glicoproteína*	Inyección intraperitoneal	Rabdovirus. Septicemia hemorrágica viral	Los siRNAs reducen la mortalidad en desafíos con VHSH. Al ser modificados, los siRNAs reducen la protección antiviral. Activación de sistema IFN.	Schyth *et al.* (2012)
Embriones de turbot	*Proteína de cápside*	Transfección	Iridovirus del besugo (red sea bream) Rabdovirus del hirame	Los miR entregados como pre-miRNA en células transfectadas, inhiben la replicación viral cuando las células fueron infectadas con el virus correspondiente. Sin embargo, el efecto inhibitorio no fue específico y se observó también en células transfectadas con un plásmido control. Activación de la vía IFN	Dang *et al.* (2008)

Continuación

Célula u organismo	Gen objetivo	Método de suministro	Virus	Resultado principal	Referencia
Células de *Haemulon plumierii*	*Proteína de cápside*	Transfección	Iridovirus del *Oplegnathus fasciatus*	Células transfectadas que producen RNAi contra la proteína de cápside viral, exhiben más resistencia al desafío con el virus que las células control	Zenke *et al.* (2010)
Células de riñón de carpa	RNA polimerasa dep. RNA y proteína de cápside	Transfección	Reovirus hemorrágico de carpa (GCR)	Los mRNAs del virus GCR fueron reducidos significativamente (sobre un 80%) en células CIK transfectadas con siRNAs e infectadas con GCR	Li *et al.* (2009)
Células de riñón de carpa (CIK)	RNA dep. RNA polimerasa (RdRp) Proteína de cápside (OCP)	Transfección	Reovirus hemorrágico de carpa (GCR)	El efecto citopático inducido por GCRV en células transfectadas fue retrasado y su intensidad reducida significativamente. El análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real mostró que la expresión de los genes virales RdRp y OCP fueron reducidos en 89% y 73% respectivamente	Ma *et al.* (2011)
Células de ovarios de carpa	Proteína de envoltura 53R	Transfección	Virus de rana grylio (RVG)	miRNA silenció la expresión de la proteína de envoltura viral y el ensamblaje de los viriones fue deficiente	Kim *et al.* (2010)

rones, para entender los mecanismos exactos de la regulación génica en este proceso (Kitagishi *et al.*, 2011).

Estrategias para suministrar dsRNA y sus limitaciones

La complejidad de suministrar el dsRNA a la célula objetivo, y mantener una cierta concentración circulando en el organismo, resulta una dificultad para aplicar *in vivo* esta interesante estrategia antiviral. En mamíferos, los siRNA son relativamente inestables en sangre en su forma nativa y rápidamente son eliminados del organismo mediante degradación por ribonucleasas, por acción renal o por ingreso no específico al sistema reticuloendotelial (Shim & Kwon, 2010). Los siRNA son macromoléculas aniónicas que no pueden ingresar fácilmente a una célula por difusión pasiva, es por ello que se hace relevante el buscar una forma de suministrarlos para permitir la circulación en el organismo y el ingreso a la célula, para así protegerlo de una posible hidrólisis enzimática, para evitar el reconocimiento del sistema inmune y finalmente para aumentar la farmacocinética del compuesto (Aagard & Rossi, 2007; Shim & Kwon, 2010).

Distintas estrategias se han probado para asegurar el ingreso del dsRNA a la célula. Una estrategia común es utilizar vehículos que protejan y faciliten el desplazamiento dentro del organismo, entre ellos los más utilizados son los liposomas, en particular los catiónicos, que debido a su naturaleza anfipática son permeables en la membrana de fosfolípidos de la célula, posibilitando el ingreso del dsRNA a su interior. Algunos ejemplos son la anisamida o 4-metoxy benzamida y el polietilenglicol (Shim & Kwon, 2010). Otra modalidad de suministro es el uso de polímeros y péptidos, ya que los siRNA se unen fácilmente a polímeros catiónicos mediante interacciones electrostáticas. La polietilenimina que se obtiene a partir de monómeros de etilenimina es el polímero más utilizado, sin embargo tiene la desventaja de ser tóxico y no biodegradable (Shim & Kwon, 2010). Los polisacáridos catiónicos como el quitosano son de bajo costo y muy abundantes, posibilitando la formación de nanopartículas con el dsRNA a través de metodologías muy sencillas (Sarathi *et al.*, 2008; Shim & Kwon, 2010; Plant & LaPatra, 2011). El quitosano se produce a partir de la quitina, polisacárido presente en forma abundante en crustáceos, no es tóxico y es biodegradable. Además presenta mucoadhesión, lo que se traduce en que las nanopartículas se adhieren a la membrana mucosa, facilitando el suministro de lo que portan en el tiempo (Plant & LaPatra, 2011). También se utilizan los polipéptidos catiónicos, como el atelocolágeno, la polilisina y la protamina (Shim & Kwon, 2010) que se acomplejan con los siRNAs a través de interacciones electrostáticas.

Uno de los cuidados que se debe tener en cuenta, es que el uso de polímeros sintéticos para la entrega de

RNAi *in vivo* es toxico dependiendo de la concentración al ser administrado en forma sistémica. Esa toxicidad puede ser aminorada por la conjugación con polímeros hidrofílicos biocompatibles como el polietilenglicol, o removiendo el exceso de polímeros catiónicos que no forman complejos. En general, se prefiere utilizar polímeros catiónicos naturales (quitosano, protamina) para la entrega de siRNA *in vivo* (Shim & Kwon, 2010).

Junto con aumentar la estabilidad y permeabilidad, se ha estudiado la mejor forma de suministrar el dsRNA al organismo objetivo. Entre los métodos utilizados como suministro, destacan la inyección directa (Posiri *et al.*, 2013), la transfección y el consumo de bacterias inactivas libres de RNasa III que sobreexpresan dsRNA, método probado exitosamente en nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) (Timmons & Fire, 2001) y en camarón (*Penaeus monodon*) (Sarathi *et al.*, 2008).

Schyth *et al.* (2007) evaluaron el potencial antiviral de siRNA sintético inyectado de forma intraperitoneal en trucha arcoíris, desafiada con el virus de la septicemia hemorrágica viral. Compararon la efectividad antiviral al inyectarlo en su forma nativa y al inyectar un formulado con un liposoma policatiónico. El formulado siRNA-liposoma logró una disminución significativa de la mortalidad, mientras que la inyección con siRNA purificado no tuvo ningún efecto sobre la mortalidad de los peces en estudio (Schyth *et al.*, 2007). Esto demuestra la incapacidad del siRNA de llegar al interior de la célula objetivo, mientras que con la ayuda de un liposoma policatiónico logra entrar y permanecer al interior de la célula con el potencial de silenciar exitosamente los mRNA virales. Se debe considerar que la inyección intraperitoneal o intramuscular es un proceso costoso que requiere mucho trabajo, además el anestesiar al organismo genera un estrés que se puede traducir en una disminución en su tasa de crecimiento. Pero tal vez el mayor problema es que no se puede inyectar un pez de menos de 20 g de peso, a pesar de que es en ese estado cuando presenta los mayores problemas con enfermedades infecciosas (Plant & LaPatra, 2011).

Sarathi *et al.* (2008) aplicaron una técnica distinta, formularon un pellet de alimento recubierto con dsRNA para alimentar camarones adultos (*Penaeus monodon*) desafiados con el virus de la mancha blanca, una de las principales enfermedades de la industria del camarón. Se formularon dos tipos de pellet, uno de ellos recubierto directamente con la bacteria que sobre-expresó el dsRNA (Fig. 2), inactivada con formaldehido, y el segundo recubierto con nanopartículas elaboradas de quitosano-dsRNA. Ambos métodos presentaron resultados positivos, con valores de supervivencia mayores al control, sin embargo, fue el pellet con la bacteria inactivada el que presentó mejores resultados de supervivencia (Sarathi *et al.*, 2008). Este método de suministro de dsRNA en alimento presenta ventajas interesantes; al no separar ni purificar el dsRNA de la célula productora, lo convierte en un método más económico. Además, el incorporarlo en el alimento en pellet, posibilita su aplicación en sistemas abiertos de cultivo como en balsas jaulas y otros sistemas masivos de cultivo.

Por otro lado, se debe considerar que la inmuno-estimulación preventiva se ha transformado en la principal herramienta profiláctica para el control de enfermedades en acuicultura, lo que hace que el correcto *delivery* de las moléculas de dsRNA que producen la inmunoestimulación sea también un desafío. Los sistemas de nano- y micro-encapsulación son herramientas prometedoras para obtener vacunas eficientes contra enfermedades de peces. En este contexto, el uso de *nanocarriers* basados en liposomas ha sido pobremente explorado en los peces, aunque han sido exitosamente utilizados en otras especies. Ruyra *et al.* (2013) reportaron el uso de transportadores liposomales con una alta eficiencia de encapsulación y baja toxicidad, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (embriones y larvas de pez cebra). Ellos mostraron que un coctel liposomal de LPS-dsRNA es capaz de entrar en contacto con hepatocitos de pez cebra y macrófagos de trucha, siendo preferen-cialmente internalizado por endocitosis. Adicional-mente mostraron que el LPS-dsRNA liposomal induce una respuesta antiviral y proinflamatoria específica en ambos tipos de células. Este diseño de sistemas de entrega conteniendo inmunoestimulantes que estimulen potentemente las vías inmunes innatas presentes en casi todos los peces, representa una estrategia completa-mente nueva y prometedora en el control y la prevención de la salud en sistemas acuícolas (Ruyra *et al.*, 2013).

dsRNA y sus efectos inmunomoduladores

En la actualidad no existen medidas terapéuticas eficaces para combatir las enfermedades virales de los peces de interés. A la fecha, las vacunas se consideran entre los métodos más efectivos que hay contra las enfermedades en acuicultura. La mayoría de éstas hoy en día utilizan adyuvantes, los cuales mejoran la respuesta humoral y celular (Ruyra *et al.*, 2013), siendo los dsRNA un candidato para potenciar este proceso. En este contexto, una gran cantidad de estudios han sido dirigidos a conocer el mecanismo de acción de los IFNs en peces. Los interferones (IFNs) son citoquinas que inducen un estado antiviral en las células y juegan un papel fundamental en la defensa frente a infecciones virales en vertebrados. A la fecha se han descrito tres tipos de IFN en vertebrados. Aquellos del tipo I y III

inician su señalización a través de distintos complejos receptores unidos a membrana y todos ellos utilizan la misma vía Jak/STAT para inducir un amplio rango de genes antivirales (Randall & Goodbourn, 2008). En mamíferos, el IFN de tipo I comprende predominantemente IFN-α e IFN-β, los cuales se relacionan con la actividad antiviral que involucra al sistema inmune innato; mientras que el IFN tipo II, que comprende IFN-γ, está asociado mayormente a una acción sobre el sistema inmune adaptativo durante la infección viral (Sun *et al.*, 2011).

Los IFNs de tipo I, IFN α/β en mamíferos, son inducidos en las células en respuesta a los productos intermediarios dsRNA de la replicación viral, generando así la primera barrera para frenar la replicación del virus (Goodbourn *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2013). Cuando IFNs de tipo I llegan al torrente circulatorio se unen al receptor de IFN α/β presente en las células y desencadenan a través de la vía de señalización JAK-STAT la transcripción de cientos de genes, algunos de los cuales codifican proteínas antivirales. Tal es el caso de la proteína quinasa R dependiente de dsRNA (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), la adenosina deaminasa específica de RNA (ADAR) y la proteína Mx (Boudinot *et al.*, 2001). Además del dsRNA viral, la transcripción de IFN tipo I puede ser inducida por otros ácidos nucleicos virales (ssRNA viral) y poly I: C (ácido poli-inosínico:poli-citidilico, dsRNA sintético), que son reconocidos por los *Toll Like Receptors* (TLRs) (Tabeta *et al.*, 2004). Los poly I:C son agonistas de los TLR, imitan las propiedades inmunoestimuladoras del dsRNA viral y se ha demostrado que poseen potencial para ser utilizados como adyuvantes de vacunas en experimentos previos (Thim *et al.*, 2012). Estos poly I:C producen inmunoestimulación a través de la vía de TLR3, localizado en las membranas endosomales y las vías de RIG-1 y MDA5, localizados en el citosol (Fig. 3). TLR3 está virtualmente presente en todos los peces y en particular, los teleósteos pueden responder a los dsRNA a través de las vías de TLR3, RIG-1 y MDA5 (Ruyra *et al.*, 2013).

Aunque se sabe poco sobre el sistema de señal del IFN en peces, la identificación de varios factores reguladores de IFN, receptores de IFN, TLRs, diferentes miembros de la vía JAK-STAT y proteínas inducidas por el IFN tipo I, sugiere que este mecanismo está muy bien conservado en peces y mamíferos. Se ha demostrado la actividad de moléculas tipo IFN frente a infecciones víricas en el suero de trucha arcoiris (De Kinkelin *et al.*, 1982). Graham & Secombes (1990) mostraron que los leucocitos de trucha arcoiris estimulados con mitógeno T-celular y en presencia de otras células, secretan una linfoquina con actividad MAF (factor de actividad de macrófagos), y más tarde observaron que a su vez presentaba actividad IFN (Graham & Secombes, 1990). Por otro lado, Congleton & Sun (1996) demostraron que tras la estimulación *in vitro* con un rabdovirus, los leucocitos de riñón de salmónidos, eran capaces de producir linfoquinas con actividad IFN.

Recientemente se han realizado esfuerzos para lograr la descripción de la respuesta antiviral, en particular, el rol del IFN en peces. Se ha sugerido que el IFN tipo I de pez cebra es homólogo al clúster génico de IFN tipo III de mamíferos, aunque esta hipótesis no ha sido probada y se encuentra en discusión (Zou *et al.*, 2007). Más recientemente se ha sugerido en peces no salmónidos, que IFN tipo I no es homólogo a ninguno de los tipos de IFN presente en mamíferos (Hamming *et al.*, 2011). En cuanto a peces salmónidos, se ha descubierto a nivel genómico un clúster génico que contiene 11 genes agrupados en subtipos IFNa1-3, IFNb1-4 e IFNc1-5 (Sun *et al.*, 2009), los cuales de acuerdo a su vía de señalización podrían ser ortólogos a IFN-α e IFN-β en humanos (Sun *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2014).

En cuanto a su funcionalidad, prácticamente no existen datos que soporten que los genes de IFN descubiertos en peces, posean efectos antivirales diferentes a los efectos clásicos que se han descrito en mamíferos. Estudios recientes que han probado la actividad *in vivo* de los distintos subtipos de IFN tipo I en salmón del Atlántico (IFNa, IFNb or IFNc), han mostrado que los tres inducen la expresión de genes antivirales (Chang *et al.*, 2014). IFNa e IFNc muestran una actividad antiviral similar, mientras que IFNb es menos activo (Svingerud *et al.*, 2012; Collet, 2014). IFNa es producido en la mayoría de las células e induce Mx, ISG15 y actividad antiviral contra IPNV. Por su parte, IFNc induce además la expresión de receptores para virus RNA (RIG-I, TLR3 y TLR7) y fuertemente, la expresión de Mx (Collet, 2014). Las proteínas Mx son una familia de GTPasas inducidas por interferón, que poseen una potente actividad antiviral, contra varios virus RNA en mamíferos y pollos, aunque los efectos antivirales de Mx en peces no se conocen mayormente. Sin embargo, en salmón del Atlántico se ha mostrado que existe una fuerte correlación entre la inhibición de IPNV y la expresión de la proteína Mx, en células de salmón estimuladas con IFN (Larsen *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la administración de IFNc podría representar un nuevo método de protección del salmón atlántico contra las infecciones virales (Chang *et al.*, 2014).

En el caso del IFN de tipo II, IFN-γ, este es más similar entre peces y mamíferos, aunque hay algunas es especies de peces que poseen un segundo tipo de IFN-γ

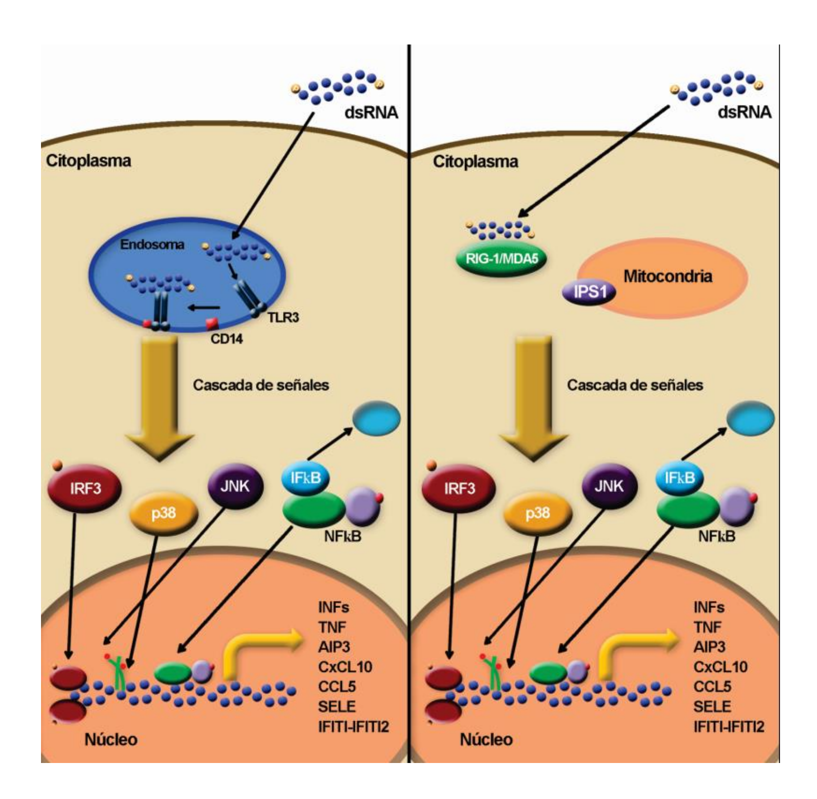


Figura 3. Activación de la vía de interferón a través de dsRNA, mediada por TLR3 (izquierda) o RIG-I/MDA5 (derecha). TLR3 reconoce los dsRNA en el lumen del endosoma (óvalo celeste), luego de lo cual dimeriza, se une a CD14 y activa una cascada de señales que lleva a su vez, a la activación de factores de transcripción. Los factores de transcripción activados se traslocan del citoplasma al núcleo, donde se unen a los promotores de sus genes blanco (IFNs, TNF, AIP3, CXCL10, CCL5, SElE, IFIT1-IFIT2) e inducen su transcripción. Por su parte, las helicasas RIG-1 y MDA5 (óvalo verde) localizadas en el citosol, reconocen el dsRNA y utilizan la proteína mitocondrial unida a membrana (IPS1, óvalo morado) como adaptador específico para activar una cascada de señales que activa a su vez, factores de transcripción que llevan a la inducción de la expresión de genes similares a los que se activan por la vía del TLR-3 (IFNs, TNF, AIP3, CXCL10, CCL5, SElE, IFIT1-IFIT2).

llamado γrel (Sun *et al.*, 2011). En cuanto a las propiedades antivirales de IFNγ en peces, se sabe muy poco, aunque se sabe que induce el gen GBP (guanylate binding protein) en trucha (Sun *et al.*, 2011). Las GBPs pertenecen a la familia de las GTPasas inducidas en respuesta a IFN. De forma similar a lo que ocurre con Mx, las GBPs poseen una potente actividad antiviral contra un amplio rango de virus RNA en mamíferos, tales como el virus de la estomatitis vesicular y el virus influenza, entre otros (Nordmann *et al.*, 2012).

En cuanto a la respuesta inhibitoria no específica causada por el interferón (inducido por dsRNA) en la célula, inicialmente complicó la aplicación de RNAi en vertebrados, sin embargo, se ha encontrado que esto ocurre sólo cuando las concentraciones de RNAi aplicados son muy elevadas, o el largo del dsRNA exógeno es mayor a los 30 pares de bases (Schyth *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2013). Considerando los efectos positivos que pueden tener los dsRNA al estimular una potente vía de inmunidad innata, es necesario progresar en los procesos que permitan implementar con mayor énfasis el concepto de inmunoestimulación preventiva, abriendo un enfoque completamente nuevo en la optimización de la salud de los peces.

Perspectivas futuras

La estrategia antiviral y/o de estimulación del sistema inmune innato utilizando dsRNA se proyecta como una alternativa real en sistemas de acuicultura que son afectados por infecciones virales. La efectividad del proceso y la secuencia-especificidad de la acción del RNAi, se muestran como sus principales ventajas. Sin embargo, la necesidad de que el dsRNA se encuentre presente al interior de la célula objetivo se convierte en la principal amenaza para este novedoso método antiviral. En consecuencia, se hace necesario investigar en tecnologías de suministro que aseguren el ingreso del dsRNA al organismo y luego a la célula objetivo. Al mismo tiempo se requiere identificar formulados que sean estables para resistir almacenaje y uso industrial a gran escala.

CONCLUSIONES

El uso de los dsRNA presenta un interesante potencial para la estimulación del sistema inmune innato y para el control de enfermedades infecciosas causadas por virus en sistemas de acuicultura. Algunos estudios han mostrado los efectos inmunomoduladores que podrían tener los dsRNA utilizados en vacunas para inducir la estimulación del sistema inmune innato. De igual forma, algunos estudios han demostrado efectividad sobre virus que causan importantes problemas en el cultivo de crustáceos y peces, entre ellos, el virus de la mancha blanca, virus hemorrágico de la carpa y el virus de la septicemia hemorrágica. Para obtener mejores resultados, es necesario profundizar en el estudio del método y formulación para suministrar eficientemente el dsRNA o los RNAi, considerando variables como la estabilidad, toxicidad, ausencia de efectos no específicos, costo, y la factibilidad de usarlo en sistemas masivos de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Erick Guiñez y Sebastián Ramírez por su apoyo en el diseño y construcción de figuras. Katherine García y Jaime Romero agradecen el aporte de Fondecyt Proyecto Postdoctorado 3120081 y Fondef D10I1056, respectivamente.

REFERENCIAS

Aagaard, L. & J.J. Rossi. 2007. RNAi therapeutics: principles, prospects, and challenges. Advan. Drug Delivery Rev., 59(2): 75-86.

Aigner, A. 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) *in vivo*: strategies based on the direct application of siRNAs. J. Biotechnol., 124(1): 12-25.

Almeida, R. & R.C. Allshire. 2005. RNA silencing and genome regulation. Trends Cell Biol., 15(5): 251-258.

Bohle, H., N. Lorenzen & B.D. Schyth. 2011. Species specific inhibition of viral replication using dicer substrate siRNAs (DsiRNAs) targeting the viral nucleoprotein of the fish pathogenic rhabdovirus viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). Antiv. Res., 90: 187-194.

Boonanuntanasarn, S., G. Yoshizaki & T. Takeuchi. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. Biochem. Biophys. Res. Commun., 310(4): 1089-1095.

Boudinot, P., S. Salhi, M. Blanco & A. Benmansour. 2001. Viral haemorrhagic septicaemia virus induces vig-2, a new interferon-responsive gene in rainbow trout. Fish Shell. Immunol., 11(5): 383-397.

Chang, C.J., C. Robertsen, B. Sun & B. Robertsen. 2014. Protection of Atlantic salmon against virus infection by intramuscular injection of IFNc expression plasmid. Vaccine, 32(36): 4695-4702.

Congleton, J. & B. Sun. 1996. Interferon-like activity produced by anterior kidney leucocytes of rainbow trout stimulated *in vitro* by infectious hematopoietic necrosis virus or Poly:C. Dis. Aquat. Org., 25: 185-195.

Collet, B. 2014. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. Dev. Comp. Immunol., 43: 160-173.

Dang, L.T, H. Kondo, T. Aoki & I. Hirono. 2008. Engineered virus-encoded pre-microRNA (pre-miRNA) induces sequence-specific antiviral response in addition to nonspecific immunity in a fish cell line: convergence of RNAi-related pathways and IFN-related pathways in antiviral response. Antiv. Res., 80(3): 316-323.

De Kinkelin, P., M. Dorson & A.M. Hattenberger-Baudouy. 1982. Interferon synthesis on trout and carp after viral infection. Dev. Comp. Immunol. Suppl., 2: 167-174.

Donze, O. & D. Picard. 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. Nucleic Acids Res., 30: e46.

Duxbury, M.S. & E.E. Whang. 2004. RNA interference: a practical approach. J. Surg. Res., 117: 339-344.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. [http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf]. Revisado: 28 septiembre 2014.

García, K., S. Ramírez-Araya, Á. Díaz, S. Reyes-Cerpa, R.T. Espejo, G. Higuera & J. Romero. 2015. Inactivated *E. coli* transformed with plasmids that produce dsRNA against infectious salmon anemia virus hemagglutinin show antiviral activity when added to infected ASK cells. Front. Microbiol., 6: 300.

Gavrilov, K. & W.M. Saltzman. 2012. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. Yale J. Biol. Medic., 85(2): 187-200.

Goodbourn, S., L. Didcock & R.E. Randall. 2000. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. J. Gen. Virol., 81(Pt10): 2341-2364.

Gotesman, M., J. Kattlun, S.M. Bergmann & M. El-Matbouli. 2013. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. Dis. Aquat. Organ., 105(2): 163-174.

Graham, S. & C.J Secombes. 1990. Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. Dev. Comp. Immunol., 14: 59-68.

Guy, D.R, S.C. Bishop, S. Brotherstone, A. Hamilton, R.J. Roberts, B.J. McAndrew & J.A. Woolliams. 2006. Analysis of the incidence of infectious pancreatic necrosis mortality in pedigreed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., populations. J. Fish Dis., 29(11): 637-647.

Hamming, O.J., G. Lutfalla, J.P. Levraud & R. Hartmann. 2011. Crystal structure of zebrafish interferons I and II reveals conservation of type I interferon structure in vertebrates. J. Virol., 85: 8181-8187.

Hedrick, R.P., O. Gilad, S. Yun, J.V. Spangenberg, G.D. Marty, R.W. Nordhausen, M.J. Kebus, H. Bercovier & A. Eldar. 2000. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. J. Aquat. Anim. Health, 12(1): 44-57.

Ilouze, M., A. Dishon & M. Kotler. 2006. Characterization of a novel virus causing a lethal disease in carp and koi. Microbiol. Molec. Biol. Rev., 70(1): 147-156.

Kim, M.S. & K.H. Kim. 2011. Inhibition of viral hemorrhagic septicemia virus replication using a short hairpin RNA targeting the G. Gene. Arch. Virol., 156(3): 457-464.

Kim, Y.S., F. Ke, X.Y. Lei, R. Zhu & Q.Y. Zhang. 2010. Viral envelope protein 53R gene highly specific silencing and iridovirus resistance in fish cells by AmiRNA. PLoS One, 23:5(4): e10308.

Kim, D.H., M.A. Behlke, S.D. Rose, M.I.S. Chang, S. Choi & J.J. Rossi. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. Nat. Biotechnol., 23(2): 222-226.

Kim, M.S., B.Y. Jee, M.Y. Cho, J.W. Kim, H.D. Jeong & K.H. Kim. 2012. Fugu double U6 promoter-driven long double-stranded RNA inhibits proliferation of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in fish cell lines. Arch. Virol., 157(6): 1029-1038.

Kitagishi, Y., N. Okumura, H. Yoshida, C. Tateishi, Y. Nishimura & S. Matsuda. 2011. Dicer functions in aquatic species. J. Amino. Acids, Article ID: 782187.

LaFauce, K & L. Owens. 2012. RNA interference with special reference to combating viruses of crustacean. Indian J. Virol., 23(2): 226-243.

Larsen, R., T.P. Røkenes & B. Robertsen. 2004. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon mx1 protein. J. Virol., 78(15): 7938-7944.

Li, B., Y.D. Fan, Y.Q. Li, J. Xu, Y. Zhou & L.B. Zeng. 2009. Highly efficient inhibition on replication of grass carp reovirus mediated by chemically synthesized small interfering RNAs. Bing Du Xue Bao., 25(5): 388-394.

Lightner, D.V. (ed.). 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Word Aquaculture Society, Baton Rouge, 304 pp.

Lima, P.C., J.O. Harris & M. Cook. 2013. Exploring RNAi as a therapeutic strategy for controlling disease in aquaculture. Fish Shell. Immunol., 34(3): 729-743.

Ma. J., W. Wang, L. Zeng, Y. Fan, J. Xu & Y. Zhou. 2011. Inhibition of the replication of Grass Carp Reovirus in CIK cells with plasmid-transcribed shRNAs. J. Virol. Meth., 175: 182e7.

Mardones, F.O., A.M. Perez, P. Valdes-Donoso & T.E Carpenter. 2011. Farm-level reproduction number during an epidemic of infectious salmon anemia virus in southern Chile in 2007-2009. Prev. Vet. Med., 102(3): 175-184.

Nylund, A., H. Plarre, M. Karlsen, F. Fridell, K.F. Ottem, A. Bratland & P.A.S. Saether. 2007. Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Arch. Virol., 152(1): 151-179.

Nordmann, A., L. Wixler, Y. Boergeling, V. Wixler & S. Ludwig. 2012. A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. FASEB J., 26: 1290-1300.

Plant, K.P. & S.E LaPatra. 2011. Advances in fish vaccine delivery. Dev. Comp. Immunol., 35(12): 1256-1262.

Posiri, P., C. Ongvarrasopone & S. Panyim. 2013. A simple one-step method for producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication. J. Virol. Meth., 188: 64-69.

Provost, P., D. Dishart, J. Doucet, D. Frendewey, B. Samuelsson & O. Radmark. 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. EMBO J., 1: 21(21): 5864-5874.

Randall, R. & S. Goodbourn. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. J. Gen. Virol., 89(Pt1): 1-47.

Ruiz, S., B.D. Schyth, P. Encinas, C. Tafalla, A. Estepa, N. Lorenzen & J.M. Coll. 2009. New tools to study RNA interference to fish viruses: fish cell lines permanently expressing siRNAs targeting the viral polymerase of viral hemorrhagic septicemia virus. Antiv. Res., 82(3): 148-156.

Ruyra, A., M. Cano-Sarabia, S.A. Mackensie, D. Mspoch & N. Roher. 2013. A novel liposome-based nanocarrier loaded with an LPS-dsRNA cocktail for fish innate immune system stimulation. PloS One, 18:8(10): e76338.

Sarathi, M., M.C. Simon, C. Venkatesan & A.S. Hameed. 2008. Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. Mar. Biotechnol., 10(3): 242-249.

Sarathi, M., M.C. Simon, C. Venkatesan, J. Thomas, M. Ravi, N. Madan, S. Thiyagarajan & A.S. Sahul-Hameed. 2010. Efficacy of bacterially expressed dsRNA specific to different structural genes ofwhite spot syndrome virus (WSSV) in protection of shrimp from WSSV infection. J. Fish Dis., 33(7): 603-607.

Schyth, B.D., N. Lorenzen & F.S. Pedersen. 2006. Antiviral activity of small interfering RNAs: specificity testing using heterologous virus reveals interferon-related effects overlooked by conventional mismatch controls. Virology, 25: 349(1): 134-141.

Schyth, B.D., N. Lorenzen & F.S. Pedersen. 2007. A high throughput *in vivo* model for testing delivery and antiviral effects of siRNAs in vertebrates. Mol. Ther., 15(7): 1366-1372.

Schyth, B.D., J.B. Bramsen, M.M. Pakula, S. Larashati, J. Kjems, J. Wengel & N. Lorenzen. 2012. *In vivo* screening of modified siRNAs for non-specific antiviral effect in a small fish model: number and localization in the strands are important. Nuclei Acids Res., 40(10): 4653-4665.

Shim, M.S. & Y.J. Kwon. 2010. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo*. FEBS J., 277(23): 4814-4827.

Shuey, D.J., D.E. McCallus & T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. Drug Discov. Today, 7(20): 1040-1046.

Solis, C.F., J. Santi-Rocca, D. Perdomo, C. Weber & N. Guillén. 2009. Use of bacterially expressed dsRNA to downregulate Entamoeba histolytica gene expression. PLoS One, 4(12): e8424.

Su, J., Z. Zhu, Y. Wang, J. Zou, N. Wang & S. Jang. 2009. Grass carp reovirus activates RNAi pathway in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. Aquaculture, 289: 1e5.

Sui, G., C. Soohoo, E.B. Affar, F. Gay, Y. Shi, W.C. Forrester & Y. Shi. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 99: 5515-5520.

Sun, B., B. Robertsen, Z. Wang & B. Liu. 2009. Identification of an Atlantic salmon IFN multigene cluster encoding three IFN subtypes with very different expression properties. Dev. Comp. Immunol., 33(4): 547-558.

Sun, B., I. Skjæveland, T. Svingerud, J. Zou, J. Jørgensen & B. Robertsen. 2011. Antiviral activity of salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type i interferon. J. Virol., 85(17): 9188-9198.

Svingerud, T., T. Solstad, B. Sun, M.L Nyrud, Ø. Kileng, L. Greiner-Tollersrud & B. Robertsen. 2012. Atlantic salmon type I IFN subtypes show differences in antiviral activity and cell-dependent expression: evidence for high IFNb/IFNc-producing cells in fish lymphoid tissues. J. Immunol., 15: 189(12): 5912-5923.

Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozak, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexoupoulou, R.A. Flavell & B. Beutler. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomega-lovirus infection. Proc. Natl. Acad. Sci., 101(10): 3516-3521.

Tenllado, F., B. Martínez-García, M. Vargas & J.R. Díaz-Ruiz. 2003. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. BMC Biotechnol., 3(1): 3.

Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol., 72(2): 211-222.

Thim, H., D. Iliev, K. Christie, S. Villoing, M. McLoughlin & S. Jorgensen. 2014. Immunoprotective activity of a Salmonid Alphavirus Vaccine: comparison of the immune responses induced by inactivated whole virus antigen formulations based on CpG class B oligonucleotides and poly I:C alone or combined with an oil adjuvant. Vaccine, 30(32): 4828-4834.

Thoulouze, M.-I., E. Bouguyon, C. Carpentier & M. Brémont. 2004. Essential role of the NV protein of *Novirhabdovirus* for pathogenicity in rainbow trout. J. Virol., 78(8): 4098-4107.

Timmons, L. & A. Fire. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. Nature, 395: 854.

Timmons, L. & A. Fire. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Gene, 263(1): 103-112.

Xie, J., L. Lü, M. Deng, S. Weng, J. Zhu, Y. Wu, L. Gan, S.M Chan & J. He. 2005. Inhibition of reporter gene and Iridovirus-Tiger Frog Virus in fish cell by RNA interference. Virology, 20: 338(1): 43-52.

Yin, G., Z. Sun, N. Liu, L. Zhang, Y. Song, C. Zhu & F. Wen. 2009. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system. Appl. Microbiol. Biotechnol., 84(2): 323-333.

Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp & D.P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell., 101: 25-33.

Zenke, K., Y.K. Nam & K.H. Kim. 2010. Development of siRNA expression vector utilizing rock bream beta-actin promoter: a potential therapeutic tool against viral infection in fish. Appl. Microbiol. Biotechnol., 85(3): 679-690.

Zou, J., C. Tafalla, J. Truckle & C.J. Secombes. 2007. Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates. J. Immunol., 179: 3859-3871.

Received: 29 September 2014; Accepted: 14 January 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 402-414, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-2

Review

The biology and ecology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) in Chilean waters: a review

Christian M. Ibáñez[1], Roger D. Sepúlveda[2], Patricio Ulloa[3]
Friedemann Keyl[4] & M. Cecilia Pardo-Gandarillas[5]
[1]Departamento de Ecología y Biodiversidad, Facultad de Ecología y Recursos Naturales
Universidad Andres Bello, Santiago, Chile
[2]Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile
[3]Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción, Concepción, Chile
[4]Thünen Institute of Sea Fisheries, Hamburg, Germany
[5]Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile
Corresponding author: Christian M. Ibáñez (christian.ibanez@unab.cl)

ABSTRACT. The jumbo squid *Dosidicus gigas* is the most abundant cephalopod species in the southeastern Pacific Ocean, which supports the biggest cephalopod fishery in the world. Due to its growing economic importance, the population growth and distributional expansion of this squid is being increasingly studied. Nevertheless, some basic features of the biology of *D. gigas* are still unknown or have been poorly investigated. In this review we summarize the known information regarding the biology and ecology of this species in the southeastern Pacific Ocean; we focus on the Chilean region in order to propose hypotheses and research lines for a better understanding the life history of this organism. Available data on the size structure, reproduction and genetics of *D. gigas* allows us to propose hypotheses related to the squid's life history traits. Based on the current literature and publications of colleagues, we propose two hypotheses regarding the effect of spatial variation on the life history of *D. gigas*. Hypothesis 1: Squids mature at large sizes and spawn in oceanic waters with warm temperatures where paralarvae and juveniles develop. Immature squids migrate near shore to feed, grow and mature, and then return to the offshore sites to spawn. Hypothesis 2: Alternatively, juvenile *D. gigas* in the oceanic zone do not migrate to coastal waters and mature at small sizes compared to individuals living near the coast that mature at larger size and migrate to oceanic waters to spawn. We provide background information about the feeding behavior and parasitism of this species, suggesting that *D. gigas* is an important trophic link in the southeastern Pacific marine ecosystem. However, more studies on the feeding habits, reproduction and parasite load are needed not only to test hypotheses proposed in this study, but also to advance the overall knowledge of this species.

Keywords: *Dosidicus gigas*, squids, reproduction, feeding, life history, Chile.

Biología y ecología del calamar *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) en aguas chilenas: una revisión

RESUMEN. *Dosidicus gigas*, es el calamar más abundante en el Pacífico suroriental, manteniendo la mayor pesquería mundial de cefalópodos. Su creciente importancia económica, ha motivado el aumento de estudios asociados al crecimiento de sus poblaciones y su expansión geográfica. Sin embargo, algunas características biológicas básicas de esta especie son desconocidas o escasamente estudiadas. En esta revisión, se resume la información sobre la biología y ecología de esta especie para el Pacífico suroriental y se proponen hipótesis y líneas de investigación para el mejor entendimiento de su historia de vida. Los datos sobre estructura de tamaños, reproducción y aspectos genéticos de la especie, permiten avanzar en las hipótesis relacionadas con la historia de vida de estos rasgos. Hipótesis 1: Los calamares maduran a gran tamaño y desovan en aguas oceánicas con temperaturas cálidas, donde paralarvas y juveniles se desarrollan. Los calamares inmaduros migran hacia la costa para alimentarse, crecer y madurar, y luego vuelven a los sitios en alta mar para desovar. Hipótesis 2: Alternativamente, los juveniles de *D. gigas* en la zona oceánica no migran a las aguas costeras y maduran peque-

Corresponding editor: Cristian Aldea

ños en comparación a los individuos que viven cerca de la costa que maduran a un tamaño más grande y migran a las aguas oceánicas para desovar. Se proponen dos hipótesis acerca de la variación espacial de la historia de vida. Además, se proporciona el marco relativo a la alimentación y parasitismo del calamar, que coloca a *D. gigas* como un importante nexo trófico en los ecosistemas marinos del Pacífico suroriental. No obstante, se necesitan más estudios relacionados con alimentación, reproducción y carga parasitaria del calamar para poner a prueba las hipótesis propuestas en este trabajo.

Palabras clave: *Dosidicus gigas*, calamares, reproducción, alimentación, historia de vida, Chile.

INTRODUCTION

Dosidicus gigas (d'Orbigny, 1835), commonly known as the jumbo squid or Humboldt squid, is an ommastrephid squid species that can reach up to 1.2 m mantle length and 3.0 m total length (Fig. 1). *D. gigas* varies in body size and exhibits sexual dimorphism, high fertility, high voracity and a variable sex ratio (Markaida, 2001; Tafur *et al*., 2010). This squid is the largest and most abundant (Nesis, 1970; Anderson & Rodhouse, 2001; Nigmatullin *et al*., 2001) marine invertebrate of the fauna of the southeastern Pacific (Schmiede & Acuña, 1992; Fernández & Vásquez, 1995). *D. gigas* is ecologically distinguished from other ommastrephids by its wide latitudinal geographic range (Nigmatullin *et al*., 2001); it has been suggested that its distribution limits could expand to Alaska and 45ºS in the southeastern Pacific Ocean (Field *et al*., 2007; Keyl *et al*., 2008). *D. gigas* is an epipelagic and mesopelagic species inhabiting oceanic and neritic waters from the sea surface to 1,200 m depth (Nesis, 1970; Nigmatullin *et al*., 2001).

Particularly due to the wide distribution (>10,000 km) of this species and the broad range of ecological conditions that it inhabits, *D. gigas* is an important model to study different aspects of biology in the fields of ecology and evolution. Here we summarized the existing biological and ecological information on *D. gigas*, including work published in Spanish and that is not yet fully digitized. Many of these sources of information in Latin America have been published as "gray literature" (*i.e.*, university theses and technical reports of national fishing institutes). The present review provides yet unpublished data on the distribution of paralarvae off the coast of Chile as well as information pertaining to the spatial variation in life history traits. Finally, this review provides background information about the feeding and parasitism of this species and a hypothesis is presented suggesting that *D. gigas* is an important trophic link in the southeastern Pacific marine ecosystem.

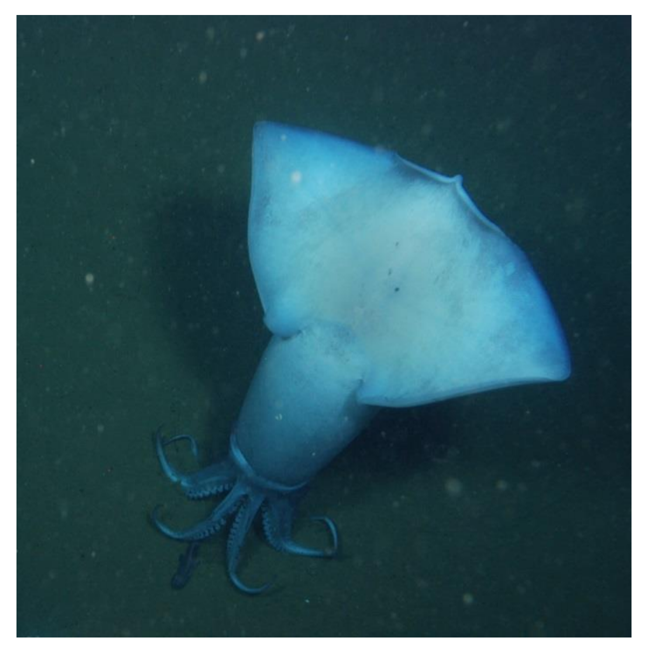


Figure 1. Specimen of the jumbo squid *Dosidicus gigas* catching a fish near Isla Mocha in spring 2010. Total length = 2.5 m. Image taken by ROV Kiel 6000 team, Chiflux cruise R/V Sonne, GEOMAR, September 2010, Chile. Photograph courtesy: Javier Sellanes.

A brief history of early research (18th to 20th centuries)

First records of *D. gigas*, in Chilean waters and in the entire South American Pacific coastal waters, were reported by Juan Ignacio Molina in the 18th century. However, in early accounts the jumbo squid was identified as belonging to the same genus as the European cuttlefish (*Sepia officinalis* Linnaeus, 1758), called *Sepia tunicata* Molina, 1782. Later, in the 19th century Alcides d'Orbigny changed the genus/species classification of the jumbo squid to *Loligo gigas* d'Orbigny, 1835 (for details regarding systematics see Nignatullin *et al*., 2001). Following this, the naturalist Claudio Gay collected some specimens for L. Hupé of the Museum of Natural History in Paris, who determined that this squid should not belong to the genera *Sepia* (Sepiidae) or *Loligo* (Loliginidae), but rather to the family Ommastrephidae d'Orbigny, 1835 (for details see Schneider, 1930). Finally, in 1857, the Danish zoologist Johan Japetus Steenstrup proposed the genus *Dosidicus*, and the German zoologist George Pfeffer synonymized *D. eschrichtii* with *D. gigas* in 1912 (for details see Nigmatullin *et al*., 2001).

During the first half of the 20th century massive strandings of *D. gigas* were reported off the Talcahuano coast around 37ºS (Scheinder, 1930; Wilhelm, 1930, 1954) producing a nuisance to the local residents. These records of strandings boosted the study of the natural history of this squid for the first time, and begged biological hypotheses to explain this phenomenon. Ten years later, García-Tello (1964, 1965) published observations on squid bioluminescence and beak morphometry.

Between 1960 and 1970 researchers from the Universidad de Chile studied the giant axon of a *D. gigas* individual collected near Valparaiso (33ºS) (see Schmiede & Acuña, 1992). Osorio *et al*. (1979) published an article regarding the economic importance of mollusks in Chile, highlighting four species of cephalopods: *Dosidicus gigas*, *Doryteuthis gahi* (d'Orbigny, 1835), *Octopus mimus* Gould, 1852 and *Robsonella fontaniana* (d'Orbigny, 1834); there were only fishing records for *D. gigas*. After 1978, *D. gigas* disappeared from Chilean coastal waters for 12 years, possibly due to environmental fluctuations caused by the El Niño events of 1982-1983 (Rocha & Vega, 2003). In the 1990's *D. gigas* returned to the Chilean coast (Schmiede & Acuña, 1992) supporting the local fishery in the Coquimbo region (30ºS), although squid catches were described as ephemeral due to short periods of great abundance followed by periods where populations disappeared for several years (Fernández & Vásquez, 1995). After the El Niño events of 1997-1998, *D. gigas* disappeared from Chilean waters again (Rocha & Vega, 2003). Since 2001 *D. gigas* has been constantly present in increasing abundance in Chilean coastal waters, which has led to a renewed effort to investigate this ommastrephid cephalopod with emphasis on studying its biology and ecology. This research is detailed in the following specific sections.

Size structure of the jumbo squid

The size structure of *D. gigas* is multimodal, varying both spatially and temporally (Nigmatullin *et al*., 2001; Chong *et al*., 2005; Ibáñez & Cubillos, 2007; Keyl *et al*., 2008; Liu *et al*., 2010; Chen *et al*., 2011). Several authors have indicated the possibility that groups of squids that mature at different sizes represent genetically discrete units, even at the sub-population or sub-specific level (Nesis, 1983; Argüelles *et al*., 2001; Nigmatullin *et al*., 2001). However, molecular studies performed using specimens of different stages of sexual maturity collected from Peru and Mexico have demonstrated that these phenotypes are not genetically different (Sandoval-Castellanos *et al*., 2009) and only represent the large phenotypic flexibility of this species (Hoving *et al*., 2013).

In coastal zones (<5 nm) offshore from Coquimbo (~30ºS), mature large squids (>80 cm mantle length, ML) and pre-mature medium squids (<60 cm ML) were collected during the winter and spring of 1993 and 1994, respectively (Fernández & Vásquez, 1995; Chong *et al*., 2005). Likewise, it was found that off the coast of Talcahuano (~37ºS) during the years 2003 and 2004 the size structure of *D. gigas* populations changed between seasons. Medium-sized specimens were found in the oceanic zone and large specimens with a high ratio of maturity were found in the coastal zone during winter. During spring medium-sized adolescent and large mature specimens were found in the oceanic zone, while small immature and large mature specimens were found close to the coast. In summer only small immature and medium-sized adolescent specimens have been recorded near the shore (Ibáñez & Cubillos, 2007). Close to the coast of Coquimbo, large specimens (65-100 cm ML) were frequently found during the entire years of 2004 and 2005, while small specimens (45-55 cm ML) were only recorded during April and May (Arancibia *et al*., 2007). Moreover, in coastal waters near Talcahuano (2004 and 2005), a modal progression of size structure was observed from winter to summer, which was dominated by large specimens (65-100 cm ML) and from summer to winter (*i.e.*, from December to August) by small specimens (25-45 cm ML) (Arancibia *et al*., 2007). In international waters outside the Chilean Exclusive Economic Zone (hereafter EEZ) the size of *D. gigas* ranged from 20.6 to 70.2 cm ML both in spring 2007 and autumn 2008 (Chen *et al*., 2011). In this context, several authors have suggested that the size structure of *D. gigas* found off the Chilean coastal is the result of a migratory pattern of jumbo squid from and to oceanic and coastal areas (Nesis, 1970; Ibáñez & Cubillos, 2007).

Age and growth of the jumbo squid

The age of cephalopods can be estimated by counting accretions in hard structures such as statoliths, beaks, and-in many decapod squids-gladii. However, the exact mechanisms of accretion can be complex and can depend on extrinsic factors such as temperature, oxygen level, and food availability (Keyl *et al*., 2011). The statolith is the hard structure most often used for aging cephalopods. However, the basic assumption of "one mark, one day" is not valid for all species (Keyl *et al*., 2011; Arkhipkin & Shcherbich, 2012). Until today it has not been possible to estimate the age and growth of *D. gigas*, mainly due to its very large and mobile nature. Because of this, there are no reported long-term laboratory experiments for this species. Nevertheless, statolith ring counting has been widely used for aging *D. gigas*. Often with this method, assuming daily

increments in the growth of statolith rings, the age of *D. gigas* individuals collected off the Chilean coast has been estimated to be one year or less (Liu *et al*., 2010; Chen *et al*., 2011). However, and contrary to the maximum number of around 450 marks which have been found, it is thought that individuals over 75 cm ML could live for 1.5 to 2 years (Liu *et al*., 2010). The first known growth study based on modal progression analysis even found ages of 3 to 4 years for specimens larger than 50 cm (Nesis, 1970). A more recent modified modal progression analysis has estimated ages of up to 32 months for individuals collected off the coast of Peru (Keyl *et al*., 2011). Moreover, a new report using a new technique for counting statolith rings reported a maximum of 832 rings in large specimens (1010 cm ML) collected in Peruvian waters (Arkhipkin *et al*., 2015).

Genetic studies of the jumbo squid

Phylogenetic studies of mitochondrial DNA have confirmed that the jumbo squid *Dosidicus gigas* belongs to the subfamily Ommastrephinae (Wakabayashi *et al*., 2006, 2012). Studies at the intra-specific level suggest that there are two genetic units, one in the Northern Hemisphere (Mexico-USA) and the other in the Southern Hemisphere (Peru-Chile), which are explained by the isolation by distance model (Sandoval-Castellanos *et al*., 2007, 2010; Staaf *et al*., 2010). Some studies using the Cytochrome b mitochondrial gene (Cyt b) and RAPDs have found genetic differences between squids caught in Peru *versus* those caught in Chile (Sandoval-Castellanos *et al*., 2007, 2010). Conversely, using sequences of the Cytochrome Oxidase I mitochondrial gene (COI) there is evidence of high gene flow between populations in Chile and Peru (Ibáñez *et al*., 2011; Ibáñez & Poulin, 2014). All studies thus far conducted are consistent in the sense that low overall genetic diversity was found, giving evidence to suggest that there has been a demographic expansion between the last glacial period and the present interglacial (Sandoval-Castellanos *et al*., 2010; Ibáñez *et al*., 2011). The historical fluctuations in the distribution range and population size of jumbo squid populations may be related to historical variation in productivity along the Humboldt Current System (HCS) (Ibáñez *et al*., 2011; Ibáñez & Poulin, 2014). Overall, these studies indicate that *D. gigas* is a species characterized by high vagility during its different ontogenetic states (*e.g.*, egg masses, paralarvae and adults) and is potentially an ecological opportunist. Assuming that *D. gigas* achieves a maximum age of more than two years, it can be expected that ontogenetic migrations (both vertical and horizontal) are possible, even across thousands of km.

Reproduction of the jumbo squid

The reproductive strategy of *D. gigas* involves multiple spawning (Rocha *et al*., 2001). The spawning is monocyclic, yielding a high fertility potential (~32 million eggs). Egg laying occurs in a separate phase and there is somatic growth between spawning events (Rocha *et al*., 2001; Nigmatullin & Markaida, 2009). Males (>65 cm ML) become sexually mature before females (>70 cm ML) (Nesis, 1970; Markaida & Sosa-Nishizaki, 2001; Ibáñez & Cubillos, 2007), which is a difference that has been described as a general feature of cephalopods (González & Guerra, 1996). However, a study utilizing specimens sampled in the EEZ off the coast of Chile showed that the composition of males and females at sexual maturity in the sample group was similar (Liu *et al*., 2010) and the length of sexual maturity was 56.5 and 63.8 cm ML for males and females, respectively. Further north, the recorded length at maturity was less than that seen in *D. gigas* specimens collected further south. In addition, severe changes in length at maturity have been reported in the north. Until the 1997/1998 El Niño, length at maturity in Peruvian waters was less than 40 cm for females and even less for males. After the El Niño event, length at maturity more than doubled in 1 to 2 years (Argüelles *et al*., 2008; Tafur *et al*., 2010). However, length at maturity can be below 20 cm in the northern HCS (Rubio & Salazar, 1992). Size at maturity depends on temperature and food availability, meaning that jumbo squid will mature at smaller sizes under warm conditions (*e.g.*, El Niño) and at larger sizes in cool conditions, allowing longer migration distances (*e.g.*, La Niña) (Keyl *et al*., 2008).

González & Chong (2006) examined 254 specimens (93 during winter and 161 during spring) collected off the coast of Coquimbo (~30°S) in 1993 and suggested based on histological evidence that reproduction is not seasonal, meaning that it is possible to find sexually mature specimens throughout the year. Similarly, in another study Nigmatullin *et al*. (2001) determined that spawning occurs throughout the year. However, other studies (*e.g.*, Clarke & Paliza, 2000; Arancibia *et al*., 2007; Liu *et al*., 2010) found evidence for two spawning groups (summer and winter). Likewise, Zúñiga *et al*. (2008) postulated the existence of two reproductive cycles, based on a regular periodicity pattern detected monthly during catches conducted between 2002 and 2005. Furthermore, the analysis of specimens caught in Peruvian waters found a “maturity baseline” with two spawning peaks (Tafur *et al*., 2010).

Gonadosomatic index (GSI) analyses of *D. gigas* conducted between July 2003 and February 2004 indicated higher GSI measurements for males during October and for females during November because of

the later maturation of females (Cubillos *et al*., 2004; Tafur *et al*., 2010). However, no spawning evidence was found during winter and spring using macroscopic examination techniques and histological analysis of the gonads (Cubillos *et al*., 2004; Gallardo, 2004). Analysis of the ratio of microelements deposited in statoliths can be useful to discriminate spawning seasons (*e.g.*, Mg:Ca and Sr:Ca, Liu *et al*., 2011). The analysis of the Sr:Ca ratio of *D. gigas* collected in the EEZ in Chile and Peru led to the conclusion by some authors that there exist two spawning seasons (autumn and winter) (Liu *et al*., 2011). However, Chen *et al*. (2011) using individuals hatched between January and December 2008 outside of the Chilean EEZ, suggested that *D. gigas* spawns throughout the year, with peaks in August and November (austral winter and spring respectively). Similar observations were made by Keyl *et al*. (2011) using samples collected inside the Peruvian EEZ. Thus evidence from different studies reveals that mature specimens of *D. gigas* may spawn throughout the year in offshore zones (*i.e.*, oceanic waters in EEZ), with two periods of maximum reproductive activity in winter and summer. Spawning also occurs in oceanic waters, as *D. gigas* paralarvae have been collected off the Chilean coast (Nesis, 1970; this study, Table 1 and Fig. 2), in Peruvian waters and in the Equatorial zone (Sakai & Yamashiro, 2013; Staff *et al*., 2013). While studies on the fecundity of *D. gigas* are insufficient, one author found that individual females in Chile could produce approximately 312,612 eggs (Gallardo, 2004). In the same study, Gallardo (2004) reported that the size of ripe eggs ranged from 0.76-2.28 mm.

Table 1. Data of *Dosidicus gigas* paralarvae collected off the coast of Central Chile during November 11-14, 2003 during the FIP 2002-12 cruises. All paralarvae were identified and measured by C.M. Ibáñez. ID: Station number.

ID	Mantle length (mm)	Temperature (°C)	Hour
1	2.0	15.5	4:25
2	1.2	16.1	1:35
3	1.5	15.8	7:52
4	1.5	13.5	0:38
5	2.5	13.7	6:40
6	2.8	14.7	16:02
7	1.2	14.8	11:50
8	3.1	16.4	21:25
9	2.5	15.3	18:42
10	3.5	15.5	11:37
11	2.0	15.6	2:00
12	2.2	16.6	7:36
13	4.0	16.3	12:55
14	1.7	15.9	5:28
15	1.5	16.3	1:50
16	1.5	16.1	21:39

The feeding of the jumbo squid

The jumbo squid is a non-selective predator with a wide trophic niche and a high consumption rate (Ibáñez, 2013). The first diet records of *D. gigas* in Chile were made by Schneider (1930) and Wilhelm (1930, 1954) who studied the stomach contents of stranded squids on Bahía Concepción beaches. In these observations remains of sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842), hake *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848), conger eels *Genypterus chilensis* (Guichenot, 1848) and *G. blacodes* (Forster, 1801), ghost shrimp *Neotrypaea uncinata* (H. Milne-Edwards, 1837) and *Pseudosquillopsis lessonii* (Guérin, 1830) and the crabs *Paraxanthus* sp. and *Epialtus* sp. were found. In addition, unidentified small mollusks were found in the gut contents, as was the first evidence of cannibalism. Several decades later in the 1990s, when *D. gigas* was again abundant off the Chilean coast, the jack mackerel *Trachurus murphyi* (Nichols, 1920) was newly recorded, as was a high degree of cannibalism (Fernández & Vásquez, 1995). From 1993 the 1994 the recorded prey species composition was similar to that described above, though it also included myctophid fishes, *Engraulis ringens* Delfin, 1901, amphipods and euphausiids (Chong *et al*., 2005). More recently, Liu *et al*. (2010) determined the existence of three main groups of prey organisms in the EEZ: lantern fish, cephalopods (including cannibalism) and crustaceans.

During the last period of high abundance of jumbo squid from 2001 to 2010, an analysis of stomach contents of *D. gigas* taken in hake fishing was performed and a high occurrence of hakes in the diet of squid was found (40%; Ulloa *et al*., 2006). This finding confirmed that hake was decreasing in abundance due to jumbo squid predation, which led to the beginning of a controversial discussion (Ibáñez, 2013). A study on *D. gigas* caught using different sampling gear (purse seine, trawl and jigs) in different fisheries (hake, jack mackerel, hoki, sardine and jumbo squid) found a bias in the stomach content of the squid according to the fishing target and gear. Jumbo squid stomach content samples from the hake fishery showed 100% *M. gayi*, while samples from mackerel fishery showed 98% *T. murphyi* (Ibáñez *et al*., 2008). The same bias occurs with cannibalism in different regions (Ibáñez & Keyl, 2010).

The majority of the feeding records of *D. gigas* are descriptive (Fernández & Vásquez, 1995; Ibáñez *et al*., 2008). Few studies have found that *D. gigas* collected off the Chilean coast do not show feeding differences

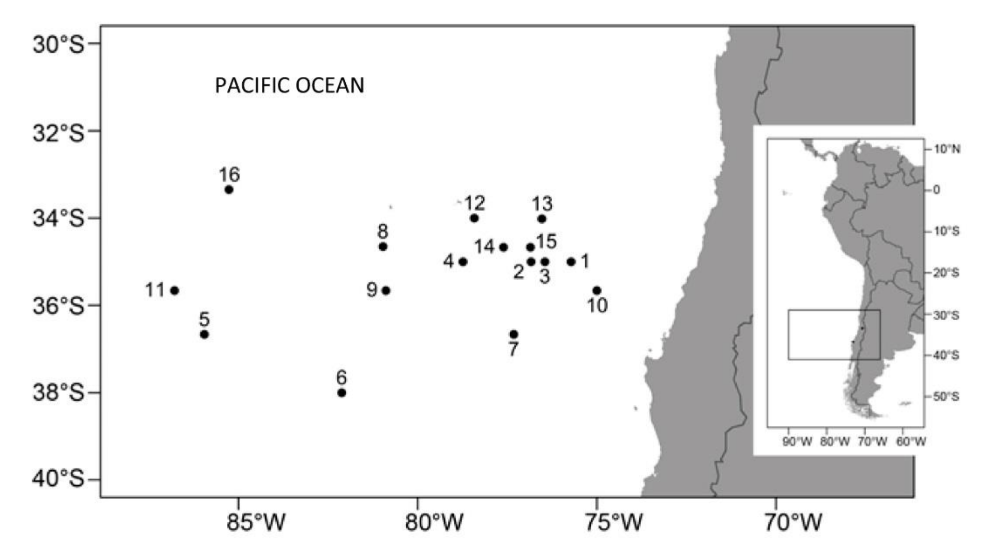


Figure 2. Sampling stations where paralarvae of *Dosidicus gigas* were captured during the project FIP 2002-12, November 11-14, 2003. For details, see Table 1.

related to their sexual and ontogenetic condition (Ulloa *et al*., 2006, 2012; Pardo-Gandarillas *et al*., 2014). Apparently, variability in stomach contents occurs on a seasonal and geographic scale, possibly due to changes in prey availability in the HCS ecosystem (Chong *et al*., 2005; Pardo-Gandarillas *et al*., 2014).

It is estimated that individual jumbo squid can consume between 100 and 901 g day^{-1} of food. This is equivalent to 1.4-4.1% of the weight of the predator (Cubillos *et al*., 2004; Arancibia *et al*., 2007). All these analyses are based on the measured stomach contents, because squid do not accept food when kept in enclosures (Arancibia *et al*., 2007). Some other studies that have been conducted to measure the consumption/ biomass ratios of jumbo squid have been shown to be biased (for details see Ibáñez, 2013).

Dietary studies using stable isotopes in *D. gigas* collected from Chilean waters showed interesting results. Both the ^{13}C and ^{15}N levels were higher in the Chilean coast than in the rest of their geographic range (Ruiz-Cooley & Gerrodette, 2012). This implies that *D. gigas* has a high trophic level consequence on its prey, and also that the squid's prey in Chilean waters has a higher trophic level.

Predators of the jumbo squid

Sperm whales (Clarke & Paliza, 2001), sharks (López *et al*., 2009, 2010) and swordfish (Ibáñez *et al*., 2004; Castillo *et al*., 2007; Letelier *et al*., 2009) are the main predators of *D. gigas* found in Chilean coastal waters. In the Eastern Pacific, the diet of sperm whale populations consists of 100% jumbo squid (Clarke *et al*., 1988; Clarke & Paliza, 2001). In food webs, *D. gigas* is assumed to have a trophic level around 4.0 (Ibáñez, 2013). In this scenario, the trophic position of *D. gigas* occupies an intermediate to high level (Fig. 3).

Parasites of the jumbo squid

Pardo-Gandarillas *et al*. (2009) described and quantified the parasitic fauna associated with *D. gigas* caught in oceanic and coastal waters in Central Chile (32ºS-40ºS). 97% of the specimens showed infestation of cestode larvae: *Hepatoxylon trichiuri* (Holten, 1802) (abundance of 2.6 and prevalence of 70.2%), *Tentacularia coryphaenae* Bosc, 1802 (0.1 abundance, 5.6% prevalence), plerocercoid Tetraphyllidea (9.1 abundance, 83.1% prevalence), *Pelichnibothrium speciosum* Monticelli, 1889, *Anisakis* Type I (0.06 abundance, 6.5% prevalence) and *Anisakis* type II (0.52 abundance, 17.7% prevalence). Among the parasite species mentioned, *H. trichiuri* is a newly recorded parasite of *D. gigas* in the latitudes of the southeastern Pacific. Other taxa were previously described for *D. gigas* inhabiting Ecuador, Peru, and northern Chile (Shukhgalter & Nigmatullin, 2001). However, genetic studies have been suggested to identify larval nematodes associated with the jumbo squid as there is limited information about these taxa and they are difficult to identify visually (Pardo-Gandarillas *et al*., 2009). The composition and abundance of the parasite communities of *D. gigas* are different between oceanic and coastal waters off of Chile, which could be explained by the type of diet of *D. gigas* in each zone (Pardo-Gandarillas *et al*., 2014). Species richness, relative abundance and diversity of parasites increase in

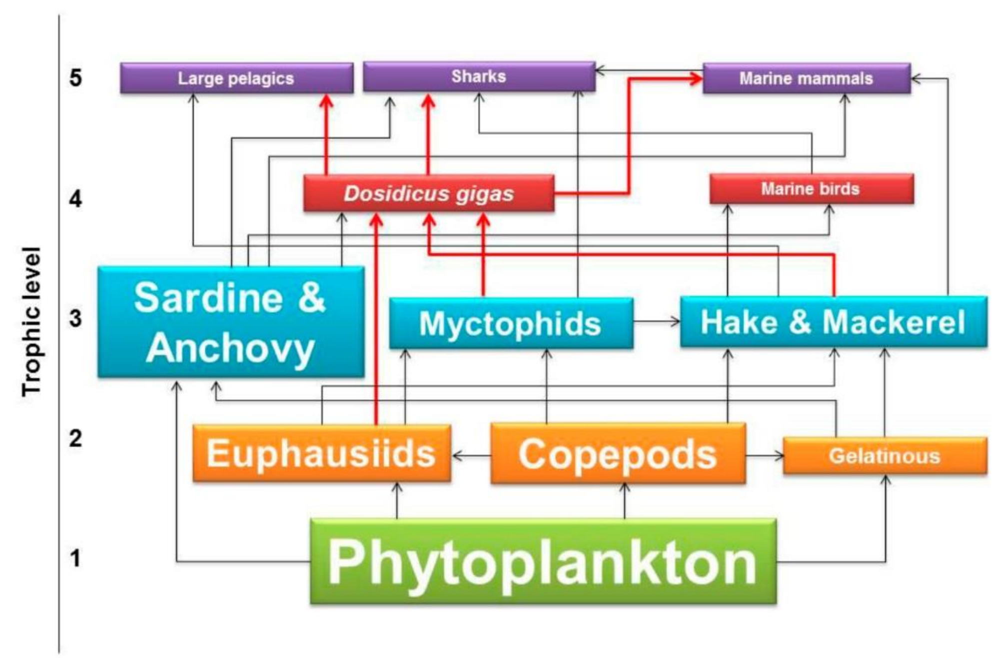


Figure 3. Trophic and parasite network. Black lines indicate trophic dynamics and red lines indicate parasite dynamics. Redrawn from Ibáñez (2013). The size of each box represents the relative biomass.

relation to squid size due to the aggregation and accumulation of parasites over time in the host (Pardo-Gandarillas *et al*., 2014). Squids can act as parathenic hosts (*i.e*., intermediate), thereby maintaining the life cycles of the parasites. These life cycles are then completed when the parasite is transferred to large predators of *D. gigas* (definitive host) such as sharks and sperm whales (Fig. 3).

FINAL REMARKS

In the last 15 years, the number of studies on the jumbo squid *D. gigas* has significantly increased in Chile and elsewhere; these new studies have covered biological, ecological, genetic and fisheries themes. Despite this growing information we still do not know much about the basic biology of this species in Chile or elsewhere. The information collected in this study allows us to formulate some hypotheses and lines of research for future studies of the jumbo squid. This can help researchers to continue learning about this species, which is an excellent model for posing questions about more general aspects of biology.

Spatial and temporal differences in water temperature and food abundance have been proposed to explain changes in maturation, growth and migration of *D. gigas* in Peruvian waters (Keyl *et al*., 2008). In line with this, we propose two hypotheses (scenario 1 and 2) to explain the patterns reported of the life history of *D. gigas* inhabiting Chilean waters. We make these hypotheses based on published information on the size structure, stage of maturation and paralarvae distribution of *D. gigas*, assuming that in Chilean waters the squid is reproducing year-round and has two pronounced spawning peaks (winter and summer) that occur in oceanic zones (Clarke & Paliza, 2000; González & Chong, 2006; Zúñiga *et al*., 2008; Liu *et al*., 2010).

Hypothesis 1: Squids mature at large sizes and spawn in oceanic waters with warm temperatures where paralarvae and juveniles (<10 mm ML) develop. Generally, it is assumed that the immature squids (<200 mm ML) migrate near shore to feed, grow and mature at large sizes (>700 mm ML), and then return to the offshore sites in order to spawn (see Fig. 4a, Scenario 1). During these ontogenetic migrations from oceanic to coastal waters and vice versa, the squids change their diet (Nesis, 1970; Pardo-Gandarillas *et al*., 2014). A similar conceptual model has been proposed in Peruvian waters; where squids migrate from coastal to oceanic waters and in doing so, change their prey preferences (Alegre *et al*., 2014). In the same way, Arkhipkin (2013) proposed that *D. gigas* utilizes the high productivity waters of the continental slope during spawning migrations to the open ocean.

Hypothesis 2: Alternatively, juvenile *D. gigas* in the oceanic zone off Chilean HCS do not migrate to coastal waters and mature at small sizes (56-63 cm ML; Liu *et al*., 2010, see Fig. 4b, Scenario 2) compared to individuals living near the coast that mature at larger size (66-71 cm ML; Ibáñez & Cubillos, 2007) and migrate to oceanic waters to spawn. The mechanisms promoting such phenotypic variation (*e.g.*, size at maturity) are not well known, but without an evolutionary

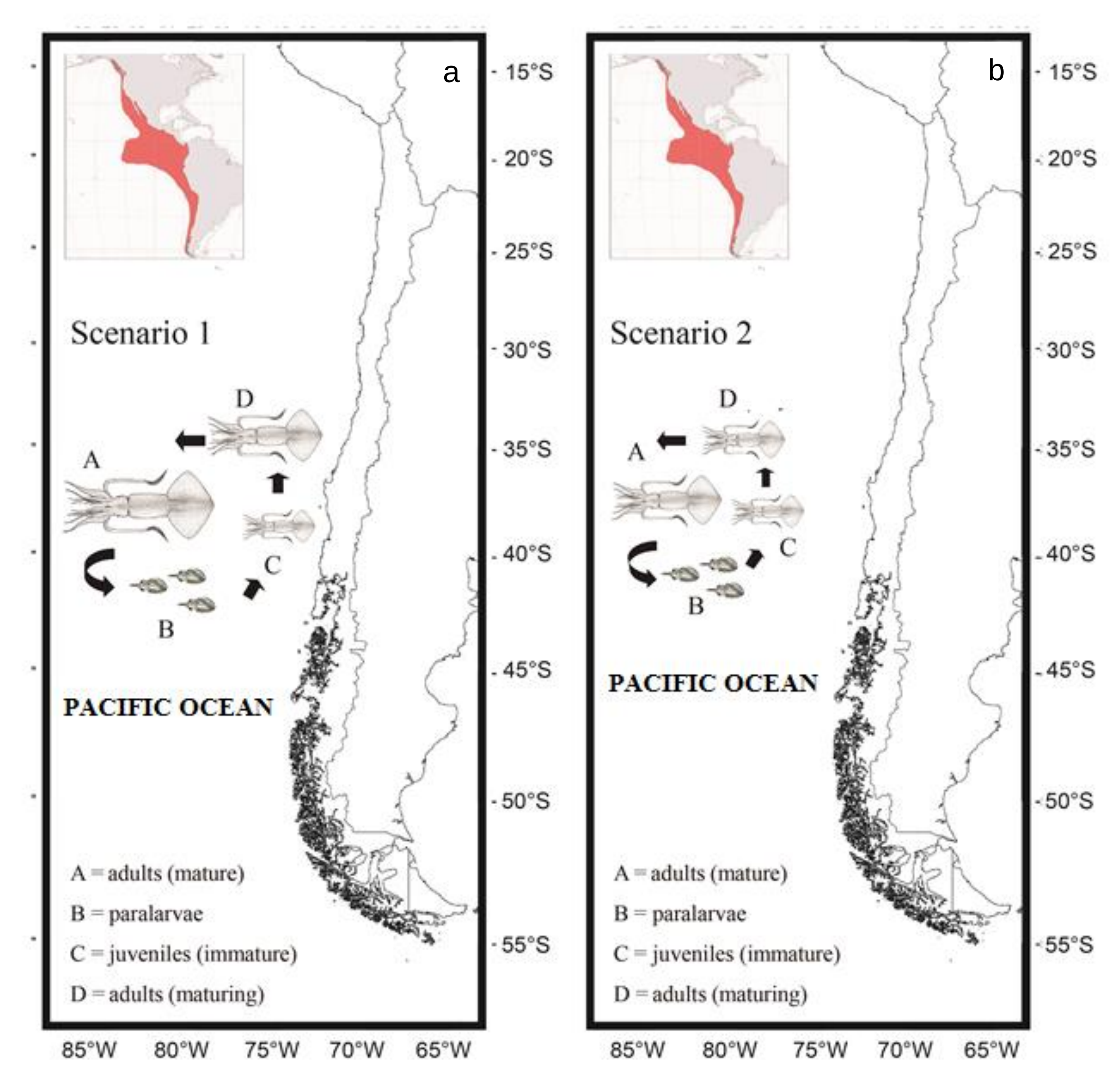


Figure 4. Hypotheses of the life-history characteristics of *Dosidicus gigas* in Chilean coastal waters. a) Scenario 1: adult squids spawn in offshore oceanic waters and sub-adults return to near shore waters to feed, grow, and mature to larger sizes. b) Scenario 2: adult squids spawn and mature in offshore oceanic waters at small sizes.

perspective it is difficult to predict the biological response of marine populations to environmental changes (Munday *et al*., 2013; Harvey *et al*., 2014). From the evolutionary point of view, phenotypic plasticity and flexibility are commonly observed in temperate marine species, which experience a great range of temporal and spatial variation in temperatures (Piersma & Drent, 2003; Somero, 2005). On one hand, *D. gigas* inhabit a variable environment and they can exhibit considerable phenotypic plasticity in their size at maturity given the temporal and spatial scale (*e.g.*, Argüelles *et al*., 2008; Keyl *et al*., 2008; Hoving *et al*., 2013). On the other hand, developmental plasticity, the environmentally induced variability experienced during development within a single genotype (Piersma & Drent, 2003), has been recently given much attention. Epigenetic forces appear to be one central mechanism promoting developmental plasticity, as environmental factors such as temperature and nutrition have been shown to impact patterns of genome methylation in marine invertebrates, altering gene expression rates (Somero, 2005; Harvey *et al*., 2014). In the case of *D. gigas*, the water temperature of the spawning area and the food quality for paralarvae could be important in determining the final size at maturity in different temporal and spatial scales. The size of hatchlings emerging from eggs is smaller with increased water temperature and when the adults are

younger when they reach maturity (Pecl & Jackson, 2008; Arkhipkin *et al*., 2015). In fish, early influences (*e.g.*, temperature, food) on life history traits can be responsible for later life-history variation (*e.g.*, fecundity, size at maturity) (Jonsson & Jonsson, 2014).

Comparing the life history traits of *D. gigas* from Chile, Peru, and Mexico (Table 2), we did not find differences in the longevity or size at maturity. Regarding fecundity and egg size (Table 2), it is difficult to make a conclusion about differences between traits of *D. gigas* from the three different locations because there are an insufficient number of studies (n < 5), which have been conducted using different methodologies. However, we assume that the life history of *D. gigas* is plastic and altered by temporal environmental changes (*e.g.*, temperature, food) in the same way as in different ecosystems as suggested by Hoving *et al*. (2013).

D. gigas plays an important role in the HCS coastal and oceanic ecosystem as it consumes a wide variety of invertebrates and fishes, and it is important prey for other cephalopods, fishes, birds and marine mammals (Ibáñez, 2013). Like other squids, the jumbo squid is considered a nutrient vector linking spatially distinct marine ecosystems (Arkhipkin, 2013). Compared to other locations (*e.g.*, Peru and Mexico) the diet of *D. gigas* off Chile is not different in terms of functional or taxonomic groups. The jumbo squid mainly feeds on mesopelagic fishes, cephalopods and euphausiids in all of these geographic regions (Markaida & Soza-Nishizaki, 2003; Ibáñez *et al*., 2008; Alegre *et al*., 2014).

It is possible that, as for many cephalopods, *D. gigas* may be a trophic bridge for the vertical transmission of parasites between its prey (crustaceans and fishes) and predators (sperm whales, swordfish and sharks) (Abollo *et al*., 1998; Pardo-Gandarillas *et al*., 2009). It is not yet clear from whom *D. gigas* acquires these parasites. Nevertheless, it is likely that the squid ingests the parasites through its diet of euphausiids, myctophids, hake and jack mackerel (Fig. 3). Jumbo squid parasites collected from Chilean, Peruvian and Equatorial waters showed differences in the presence and absence of some taxa (Shukhgalter & Nigmatullin, 2001; Pardo-Gandarillas *et al*., 2009; Céspedes *et al*., 2011). However, most of these parasites have high rates of synonymy when identified by light microscopy, and molecular analysis is needed to improve robust identification of rare taxa (Pardo-Gandarillas *et al*., 2009).

To understand fully the biology and ecology of *D. gigas* in Chilean waters from an evolutionary perspective, it is necessary to perform new phylogeographic studies of the Chilean-Peruvian population(s). Furthermore, it is important to account for processes underlying patterns in the physical oceanography. For these future studies, it is necessary to incorporate variables related to adult migration, dispersal of egg masses and dispersal of paralarvae.

Future research on jumbo squids in Chilean waters should address the following:

1. Increase our knowledge on the diversity, structure and genetic characterization of *D. gigas* populations in the Peruvian-Chilean province using novel molecular markers (*e.g.*, microsatellites, SNPs). This information is important in order to establish conservation strategies conducive to population management in both Chile and Peru.
2. Incorporate satellite tagging of the Peruvian-Chilean populations, similar to studies conducted in the Northern Hemisphere (Gilly *et al*., 2006; Bazzino *et al*., 2010). This will help clarify an important part of *D. gigas's* life cycle, such as rhythms and directionality of horizontal and vertical migrations.
3. Clarify the controversy about whether populations of *D. gigas* in Chile reproduce all year or whether there are certain periods where such events occur more frequently.
4. Implement a spatial and temporal monitoring system of *D. gigas* in Chile measuring growth, reproduction and feeding, among others.
5. Improve consumption estimations and perform feeding-related studies of *D. gigas* using various approaches (*e.g.*, stomach content, stable isotopes, lipids and DNA).
6. Perform genetic studies on the squid parasites to determine the taxonomic identity of the parasite species.
7. Determine the biological condition of squids and establish how they are impacted by environmental and ecological factors of their environment, especially during ENSO events.
8. Evaluate populations of *D. gigas* sampling their complete distribution and testing for potential phenotypic differences (*e.g.*, size at maturity). In addition, evaluate whether these differences are defined by geography (latitudinal change) or by environmental variation such as temperature, salinity, and/or productivity.
9. Standardize the different methods used to study *D. gigas* in Chilean waters in order to generate a framework including all relevant information about this species.
10. Estimate heritability of size at maturity in a microevolutionary context, and evaluate how natural selection drives changes in the size at maturity. Addi-

Table 2. Comparative data of *Dosidicus gigas* life history. [a]Tafur *et al*. (2010); [b]Chen *et al*. (2010); [c]Arguelles *et al*. (2001); [d]Markaida (2001); [e]Gallardo (2004); [f]Nesis (1970). *Estimation based on one mature female.

Life history traits	Chile	Peru	Mexico
Size at maturity males (mm)	250 - 796[a]	170 - 800[a]	180 - 760[a]
Size at maturity females (mm)	400 - 890[a]	150 - 900[a]	200 - 800[a]
Longevity males (days)	127 - 302[b]	120 - 325[c]	367 - 372[d]
Longevity females (days)	150 - 307[b]	110 - 345[c]	434 - 442[d]
Fecundity males (spermatophores)	1,347 - 3,059[e]	500 - 1,334[f]	54 - 1,334[d]
Fecundity females (eggs)	312,612[e*]	100×10^5 - 650×10^5 [f]	5.2×10^6 - 32×10^6 [d]
Egg size (mm)	0.76 - 2.28[e]	0.90 - 1.10[f]	0.87 - 1.11[d]

tionally, study the RNA/DNA ratios to evaluate different growth rates related to the hypotheses proposed.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Javier Sellanes of the Universidad Católica del Norte, Coquimbo-Chile, for the jumbo squid image. We thank Chingis Nigmatullin for his suggestion to write this article, and Lafayette Eaton and Emily Giles for their comments and help to improve the English. Data from FIP 2002-12 were provided by Luis Cubillos of the Universidad de Concepción.

REFERENCES

Abollo, E., C. Gestal, A. López, A.F. González, A. Guerra & S. Pascual. 1998. Squid as trophic bridges for parasites flow within marine ecosystems: the case of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae), or when the wrong way can be right. S. Afr. J. Mar. Sci., 20: 223-232.

Alegre, A., F. Ménard, R. Tafur, P. Espinoza, J. Argüelles, V. Maehara, O. Flores, M. Simier & A. Bertrand. 2014. Comprehensive model of jumbo squid *Dosidicus gigas* trophic ecology in the northern Humboldt Current System. PLoS One 9(1): e85919. doi:10.1371/journal.pone.0085919.

Anderson, C.I.H. & P.G. Rodhouse. 2001. Life cycles, oceanography, and variability: ommastrephid squid in variable oceanographic environments. Fish. Res., 54: 133-143.

Arancibia, H., M. Barros, S. Neira, U. Markaida, C. Yamashiro, L. Icochea, C. Salinas, L. Cubillos, C.M. Ibáñez, R. León, M. Pedraza, E. Acuña, A. Cortés & V. Kesternich. 2007. Análisis del impacto de la jibia en las pesquerías chilenas de peces demersales, Informe Final, Proyecto FIP 2005-38: 299 pp.

Argüelles, J., P.G. Rodhouse, P. Villegas & G. Castillo. 2001. Age, growth, and population structure of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* in Peruvian waters. Fish. Res., 54: 51-61.

Argüelles, J., R. Tafur, A. Taipe, P. Villegas, F. Keyl, N. Domínguez & M. Salazar. 2008. Size increment of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* mature females in Peruvian waters, 1989-2004. Progr. Oceanogr., 79: 308-312.

Arkhipkin, A.I. 2013. Squid as nutrient vectors linking southwest Atlantic marine ecosystems. Deep-Sea Res. II, 95: 7-20.

Arkhipkin, A.I. & Z.N. Shcherbich. 2012. Thirty years' progress in age determination of squid using statoliths. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 92: 1389-1398.

Arkhipkin, A.I., J. Argüelles, Z.N. Shcherbich & C. Yamashiro. 2015. Ambient temperature influence adult size and life span in jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 72(3): 400-409.

Bazzino, G., W.F. Gilly, U. Markaida, C.A. Salinas-Zavala & J. Ramos-Castillejos. 2010. Horizontal migrations, vertical habitat utilization and diet of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Pacific Ocean off Baja California Sur, Mexico. Progr. Oceanogr., 86: 59-71.

Castillo, K., C.M. Ibáñez, C. González & J. Chong. 2007. Dieta del pez espada *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758 en distintas zonas de pesca frente a Chile central durante el otoño de 2004. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 42: 149-156.

Céspedes, R.E., J. Iannacone & A. Salas. 2011. Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* "Pota" eviscerada en Arequipa, Perú. Ecol. Aplic., 10: 1-11.

Chen, X., H. Lu, B. Liu & Y. Chen. 2011. Age, growth, and population structure of jumbo flying squid, *Dosidicus gigas*, based on statolith microstructure off the exclusive economic zone of Chilean waters. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 91: 229-235.

Chong, J., C. Oyarzún, R. Galleguillos, E. Tarifeño, R.D. Sepúlveda & C.M. Ibáñez. 2005. Parámetros biológico-pesqueros de la jibia *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835)

(Cephalopoda: Ommastrephidae) frente a la costa de Chile central (29ºS-40ºS) durante 1993-1994. Gayana, 69: 319-328.

Clarke, R. & O. Paliza. 2000. The Humboldt Current squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835). Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 35: 1-39.

Clarke, R. & O. Paliza. 2001. The food of sperm whales in the southeast Pacific. Mar. Mammal Sci., 17: 427-429.

Clarke, R., O. Paliza & A. Aguayo. 1988. Sperm whales of the southeast Pacific. Part. IV. Fatness, food and feeding. Invest. Cetacea, Berne, 21: 53-195.

Cubillos, L., C. Ibáñez, C. González & A. Sepúlveda. 2004. Pesca de jibia (*Dosidicus gigas*) con red de cerco entre la V y X Regiones, año 2003. Informe Final Pesca de Investigación, Instituto de Investigación Pesquera, Talcahuano, Chile, 52 pp.

Fernández, F. & J.A. Vásquez. 1995. La jibia gigante *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) en Chile: análisis de una pesquería efímera. Estud. Oceanol., 14: 17-22.

Field, J.C., K. Baltz, A.J. Phillips & W.A.Walker. 2007. Range expansion and trophic interactions of the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, in the California Current. Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep., 48: 131-146.

Gallardo, M. 2004. Descripción de la biología reproductiva gonádica de *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) para la costa de Chile. Tesis de Biología Marina, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción, 43 pp.

García-Tello, P. 1964. Nota preliminar sobre una observación de bioluminiscencia en *Dosidicus gigas* (D'Orb) Cephalopoda. Bol. Univ. Chile, 46: 27-28.

García-Tello, P. 1965. Utilización de la mandíbula inferior de la jibia *Dosidicus gigas* (D'Orb) en el cálculo de su peso total (Mollusca, Cephalopoda, Ommastrephidae). Rev. Biol. Mar., 12: 185-197.

Gilly, W.F., U. Markaida, C.H. Baxter, B.A. Block, A. Boustany, L. Zeidberg, K. Reisenbichler, B. Robison, G. Bazzino & C. Salinas. 2006. Vertical and horizontal migrations by the squid *Dosidicus gigas* revealed by electronic tagging. Mar. Ecol. Prog. Ser., 324: 1-17.

González, P. & J. Chong. 2006. Biología reproductiva de *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda, Ommastrephidae) en la zona norte-centro de Chile. Gayana, 70: 65-72.

González, A.F. & A. Guerra. 1996. Reproductive biology of the short-finned squid *Illex coindetti* (Cephalopoda: Ommastrephidae) of the northeastern Atlantic. Sarsia, 81: 107-118.

Harvey, B.P., B. Al-Janabi, S. Broszeit, R. Cioffi, A. Kumar, M. Aranguren-Gassis, A. Bailey, L. Green, C.M. Gsottbauer, E.F. Hall, M. Lechler, F.P. Mancuso, C.O. Pereira, E. Ricevuto, J.B. Schram, L.S. Stapp, S. Stenberg, & L.T. Santa Rosa. 2014. Evolution of marine organisms under climate change at different levels of biological organization. Water, 6: 3545-3574.

Hoving, H.J.T., W.F. Gilly, U. Markaida, K.J. Benoit-Bird, Z.W. Brown, P. Daniel, J.C. Field, L.Z. Parassenti, B. Liu & B. Campos. 2013. Extreme plasticity in life-history strategy allows a migratory predator (jumbo squid) to cope with a changing climate. Glob. Change Biol., 19: 2089-2103.

Ibáñez, C.M. 2013. El impacto ecológico del calamar *Dosidicus gigas* sobre las poblaciones de peces en el Océano Pacífico. Amici Molluscarum, 21: 7-16.

Ibáñez, C.M. & L.A. Cubillos. 2007. Seasonal variation in the length structure and reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) off central-south Chile. Sci. Mar., 71: 123-128.

Ibáñez, C.M. & F. Keyl. 2010. Cannibalism in cephalopods. Rev. Fish Biol. Fisher., 20: 123-136.

Ibáñez, C.M. & E. Poulin. 2014. Genetic structure and diversity of squids with contrasting life histories in the Humboldt Current System. Hidrobiologica, 24: 1-19.

Ibáñez, C.M., H. Arancibia & L.A. Cubillos. 2008. Biases in determining the diet of jumbo squid *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) off southern-central Chile (34ºS-40ºS). Helgoland Mar. Res., 62: 331-338.

Ibáñez, C.M., C. González & L. Cubillos. 2004. Dieta del pez espada *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758, en aguas oceánicas de Chile central en invierno de 2003. Invest. Mar., Valparaíso, 32: 113-120.

Ibáñez, C.M., L.A. Cubillos, R. Tafur, J. Argüelles, C. Yamashiro & E. Poulin. 2011. Genetic diversity and demographic history of *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in the Humboldt Current System. Mar. Ecol. Prog. Ser., 431: 163-171.

Jonsson, B. & N. Jonsson. 2014. Early environment influences later performance in fishes. J. Fish Biol., 85: 151-188.

Keyl, F., J. Argüelles & R. Tafur. 2011. Interannual variability in size structure, age, and growth of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) assessed by modal progression analysis. ICES J. Mar. Sci., 68: 507-518.

Keyl, F., J. Argüelles, L. Mariátegui, R. Tafur, M. Wolff & C. Yamashiro. 2008. A hypothesis on range expansion and spatio-temporal shifts in size-at-maturity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the eastern Pacific Ocean. CalCOFI. Invest. Rep., 49: 119-128.

Letelier, S., R. Meléndez, E. Carreño, S. López & P. Barría. 2009. Alimentación y relaciones tróficas del pez espada (*Xiphias gladius* Linnaeus, 1758), frente a Chile centro-norte durante 2005. Lat. Am. J. Aquat. Res., 37: 107-119.

Liu, B., X. Chen, Y. Chen, H. Lu & W. Qian. 2011. Trace elements in the statoliths of jumbo flying squid off the Exclusive Economic Zones of Chile and Peru. Mar. Ecol. Prog. Ser., 429: 93-101.

Liu, B., X. Chen, H. Lu, Y. Chen & W. Qian. 2010. Fishery biology of the jumbo flying squid *Dosidicus gigas* off the Exclusive Economic Zone of Chilean waters. Sci. Mar., 74: 687-695.

López, S., R. Meléndez & P. Barría. 2009. Alimentación del tiburón marrajo *Isurus oxyrinchus* Rafinesque, 1810 (Lamniformes: Lamnidae) en el Pacífico suroriental. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 44: 439-451.

López, S., R. Meléndez & P. Barría. 2010. Preliminary diet analysis of the blue shark *Prionace glauca* in the eastern South Pacific. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 45: 745-749.

Markaida, U.A. 2001. Biología del calamar gigante *Dosidicus gigas* Orbigny, 1835 (Cephalopoda: Ommastrephidae) en el golfo de California, México. Tesis Doctoral. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, 387 pp.

Markaida, U. & O. Soza-Nishizaki. 2001. Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. Fish. Res., 54: 63-82.

Markaida, U. & O. Soza-Nishizaki. 2003. Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 83: 1-16.

Munday, P.L., R.R. Warner, K. Monro, J.M. Pandolfi & D.J. Marshall. 2013. Predicting evolutionary responses to climate change in the sea. Ecol. Lett., 16: 1488-1500.

Nesis, K.N. 1970. The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. Okeanology, 10: 140-152.

Nesis, K.N. 1983. *Dosidicus gigas*. In: P.R. Boyle (ed.). Cephalopod life cycles, Vol. 1. Species accounts. Academic Press, London, pp. 216-231.

Nigmatullin, C.M. & U. Markaida. 2009. Oocyte development, fecundity, and spawning strategy of large sized jumbo squid *Dosidicus gigas* (Oegopsida: Ommastrephinae). J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 89: 789-801.

Nigmatullin, C.M., K.N. Nesis & A.I. Arkhipkin. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fish. Res., 54: 9-19.

Osorio, C., J. Atria & S. Mann. 1979. Moluscos marinos de importancia económica en Chile. Biol. Pesq., 11: 3-47.

Pardo-Gandarillas, M.C., K. Lorhmann, A.L. Valdivia & C.M. Ibáñez. 2009. First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current System off Chile. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 44: 397-408.

Pardo-Gandarillas, M.C., K. Lorhmann, M. George-Nascimento & C.M. Ibáñez. 2014. Diet and parasites of *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current System. Molluscan Res., 34: 10-19.

Pecl, G.T. & G.D. Jackson. 2008. The potential impacts of climate change on inshore squid: biology, ecology and fisheries. Rev. Fish Biol. Fish., 18: 373-385.

Piersma, T. & J. Drent. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. Trends Ecol. Evol., 18: 228-233.

Rocha, F. & M.A. Vega. 2003. Overview of the cephalopod fisheries in Chilean waters. Fish. Res., 60: 151-159.

Rocha, F., A. Guerra & F. González. 2001. A review of the reproductive strategies in cephalopods. Biol. Rev., 76: 291-304.

Ruiz-Cooley, R.I. & T. Gerrodette. 2012. Tracking large-scale latitudinal patterns of d13C and d15N along the E Pacific using epi-mesopelagic squid as indicators. Ecosphere, 3(7): 1-17.

Rubio, R.J. & C. Salazar. 1992. Prospección pesquera del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) a bordo del buque japonés "Shinko Maru 2". Informe Instituto del Mar del Perú, 103: 3-32.

Sakai, M. & C. Yamashiro. 2013. Crucero de investigación conjunta del calamar gigante *Dosidicus gigas*. Instituto del Mar del Perú, Callao, 77 pp.

Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer & P. Díaz-Jaimes. 2007. Population genetic structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) evaluated by RAPD analysis. Fish. Res., 83: 113-118.

Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer & P. Díaz-Jaimes. 2009. Lack of genetic differentiation among size groups of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Cienc. Mar., 35: 419-428.

Sandoval-Castellanos, E., M. Uribe-Alcocer & P. Díaz-Jaimes. 2010. Population genetic structure of Humboldt squid (*Dosidicus gigas*) inferred by mitochondrial DNA analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 385: 73-78.

Schmiede, P. & E. Acuña. 1992. Regreso de las jibias (*Dosidicus gigas*) a Coquimbo. Rev. Chil. Hist. Nat., 65: 389-390.

Schneider, C.O. 1930. Notas sobre la jibia chilena (*Ommastrephes gigas*, Hupé). Bol. Soc. Biol. Concepción, 3-4: 117-124.

Shukhgalter, O.A. & Ch.M. Nigmatullin. 2001. Parasitic helminths of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in open waters of the central east Pacific. Fish. Res., 54: 95-110.

Somero, G.N. 2005. Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. Front. Zool., 2: 1. doi:10.1186/ 1742-9994-2-1.

Staaf, D.J., R.I. Ruiz-Cooley, C. Elliger, Z. Lebaric, B. Campos, U. Markaida & W.F. Gilly. 2010. Ommastrephid squids *Sthenoteuthis oualaniensis* and *Dosidicus gigas* in the eastern Pacific show convergent biogeographic breaks but contrasting population structures. Mar. Ecol. Prog. Ser., 418: 165-178.

Staff, D.J., J.V. Redfern, W.F. Gilly, W. Watson, & L.T. Balance. 2013. Distribution of ommastrephid paralarvae in the eastern tropical Pacific. Fish. Bull., 111: 78-89.

Tafur, R., F. Keyl & J. Argüelles. 2010. Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in relation to environmental variability of the northern Humboldt Current System. Mar. Ecol. Prog. Ser., 400: 127-141.

Ulloa, P., M. Fuentealba & V.H. Ruiz. 2006. Hábitos alimentarios de *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Teuthoidea) frente a la costa centro-sur de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat., 79: 475-479.

Ulloa, P., V.H. Ruiz & R. Figueroa. 2012. Digestión secundaria en el análisis del contenido gástrico del calamar rojo *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Teuthoidea): ¿qué tan importante es? Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 47: 413-428.

Wakabayashi, T., N. Suzuki, M. Sakai, T. Ichii & S. Chow. 2006. Identifications of ommastrephid squid paralarvae collected in northern Hawaiian waters and phylogenetic implications for the family Ommastrephidae using mtDNA analysis. Fish. Sci., 72: 494-502.

Wakabayashi, T., N. Suzuki, M. Sakai, T. Ichii & S. Chow. 2012. Phylogenetic relationships among the family Ommastrephidae (Mollusca: Cephalopoda) inferred from two mitochondrial DNA gene sequences. Mar. Genom., 7: 11-16.

Wilhelm, O. 1930. Las mortandades de jibias (*Ommastrephes gigas*) en la Bahía de Talcahuano. Bol. Soc. Biol. Concepción, 3-4: 23-28.

Wilhelm, O. 1954. Algunas observaciones acerca de las mortandades de jibias (*Dosidicus gigas* D'Orb.) en el litoral de Concepción. Rev. Biol. Mar., 4: 196-201.

Zúñiga, M.J., L.A. Cubillos & C.M. Ibáñez. 2008. A regular pattern of periodicity in the montly catches of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) along the Chilean coast (2002-2005). Cienc. Mar., 34: 91-99.

Received: 12 May 2014; Accepted: 27 February 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 415-423, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-3

Review

Estado actual del cultivo de larvas del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*)

María Isabel Abdo-de la Parra[1,2], L. Estela Rodríguez-Ibarra[1], Gustavo Rodríguez-Montes de Oca[3]
Gabriela Velasco-Blanco[1] & Leonardo Ibarra-Casto[1]
[1]Laboratorio de Reproducción y Larvicultura de Peces Marinos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán, Av. Sábalo Cerritos s/n, 82100, Mazatlán, México
[2]Posgrado de Ciencias Agropecuarias del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Km. 17,5 Carretera Culiacán-Dorado, C.P. 8000, Culiacán, Sinaloa, México
[3]Laboratorio de Reproducción y Cultivo de Peces, Facultad de Ciencias del Mar
Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen s/n, C.P. 82000, Mazatlán, Sinaloa, México
Corresponding author: María Isabel Abdo-de la Parra (abdo@ciad.mx)

RESUMEN. El pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) es un pez marino con alta demanda en los mercados de algunos países de Latinoamérica. Debido a su importancia se inició su cultivo en jaulas flotantes usando juveniles silvestres. A partir de la década pasada se iniciaron los primeros estudios para lograr su reproducción en cautiverio y la producción masiva de juveniles que puedan sustentar el cultivo completo. El presente trabajo presenta los resultados obtenidos hasta la fecha sobre desove, manejo e incubación de huevos y protocolos de larvicultura del pargo flamenco en Latinoamérica.

Palabras clave: *Lutjanus guttatus*, pargo flamenco, desove, huevos, larvas, acuicultura.

State of art for larval rearing of spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*)

ABSTRACT. The spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) is a marine fish species highly appreciated in local markets of some countries of Latin America. For this reason at first wild juveniles were captured and stocked in floating cages for aquaculture. Since the last decade the first studies about reproduction in captivity and massive juvenile production were started in order to supply continue culture. The current study presents up to date results regarding spawning, egg management and incubation and larval rearing protocols for the spotted rose snapper in Latin America.

Keywords: *Lutjanus guttatus*, spotted rose snapper, spawn, eggs, larvae, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

La piscicultura marina es una actividad que contribuye sustantivamente a la economía de muchos países, mediante la generación de alimento con alto valor nutricional, empleos y divisas. Hace algunos años, esta actividad se basó en Europa y Asia principalmente en el cultivo de juveniles silvestres (Tucker, 1998); sin embargo, en la actualidad la producción continua de juveniles en cautiverio se está incrementando. En el sureste de Asia, las especies cuya biotecnología de producción de juveniles ya está bien establecida son el sabalote (*Chanos chanos*) y barramundi (*Lates calcarifer*); en Japón, el pargo japonés (*Pagrus major*); en el Mediterráneo, la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*) y, en Estados Unidos, la corvina (*Sciaenops ocellatus*) (Tucker, 1998). En Latinoamérica, el cultivo de peces marinos es una actividad en pleno crecimiento y desarrollo, sobre la base casi exclusivamente en la engorda de juveniles extraídos del medio. La producción constante, confiable y en el momento adecuado de juveniles de calidad, es un requerimiento indispensable para el cultivo de peces marinos (Alvarez-Lajonchère *et al*., 2012). Por lo tanto, es imprescindible contar con las técnicas de cultivo adecuadas y sistemas de producción eficientes que permitan que la especie cultivada alcance un desempeño satisfactorio. El pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) se distribuye en el Pacífico oriental, desde México hasta Perú (Fischer

Corresponding editor: Guido Plaza

et al., 1995). Es una especie con alto potencial para su cultivo ya que presenta alta demanda en los mercados de algunos países Latinoamericanos, por lo que las investigaciones sobre su reproducción artificial se iniciaron hace varios años en Colombia (Valverde & Boza, 1999), Panamá (Cano, 2003), Costa Rica (Boza-Abarca *et al*., 2008) y Ecuador (Benetti & Wilson, 1996). En México, las investigaciones sobre el cultivo de esta especie se iniciaron en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán (CIAD), desde el año 2000 (García-Ortega *et al*., 2005). En la actualidad se han logrado grandes avances para obtener la producción masiva de juveniles de calidad que sustenten el cultivo de esta importante especie.

Reproductores

El pargo flamenco es una especie gonocórica, con sexos separados, sin dimorfismo sexual aparente, fertilización externa y sin cuidado paternal. Su desarrollo gonadal es asincrónico con desoves parciales por la presencia de ovocitos con desarrollo avanzado y folículos post-ovulatorios en diferentes grados de reabsorción, liberados en diferentes tiempos (Cruz-Romero *et al*., 1996). La actividad reproductiva ocurre prácticamente todo el año; con máximos en abril-mayo y octubre-noviembre. En enero y febrero cesa totalmente la reproducción, principalmente por las bajas temperaturas (Rojas, 1997; Arellano-Martínez *et al*., 2001; Alvarez-Lajonchère & Ibarra-Castro, 2011). Para obtener el banco de reproductores y realizar la inducción artificial, los organismos silvestres se pueden capturar por medio de chinchorros, anzuelos y línea de fondo (palangre), por pescadores artesanales en la época de reproducción, a profundidades de 30-50 m. De acuerdo a lo recomendado por Benetti & Feeley (1999), a los peces con barotrauma (abultamiento de la vejiga gaseosa debido a cambios de presión durante el ascenso) se les practica una punción de la vejiga gaseosa con una aguja hipodérmica para retirar el exceso de gas y estabilizar al animal en la columna de agua. Posteriormente, se trasladan a las instalaciones correspondientes. Ibarra-Castro *et al*. (2012a) señalan que es posible mantener un banco de reproductores obtenido de juveniles producidos en laboratorio y posteriormente, cultivarlos en jaulas hasta alcanzar la talla adecuada para su reproducción.

Control de la reproducción

Para lograr con éxito el cultivo de peces marinos se requiere la producción sostenida de huevos de calidad (Bromage, 1995). En general, los reproductores capturados del medio ambiente o los que son criados en cautiverio, reciben condiciones medioambientales inapropiadas para lograr la maduración final y liberación de gametos; por lo cual, es necesario aplicar tratamientos hormonales para lograrlo. A partir de los años 30 se han utilizado hormonas exógenas para estimular el proceso reproductivo e inducir a la ovulación, espermiación y desove de peces marinos (Zohar & Mylonas, 2001). Para establecer los protocolos de inducción a la maduración final del pargo flamenco, se han realizado diversos estudios: Valverde & Boza (1999) inyectaron a hembras silvestres con 4 mg de extracto de pituitaria de carpa (EPC) de peso por kg corporal (PC), y después de 24 h las hembras desovaron. Boza-Abarca *et al.* (2008) indujeron el desove de *L. guttatus* engordado en jaulas, utilizando dos inyecciones de gonadotropina coriónica humana (hCG): la primera de 4,5 mg hCG kg^{-1} PC y la segunda de 3,5 mg hCG kg^{-1} PC; después de 9 a 12 h las hembras desovaron. Recientemente, Boza-Abarca *et al*. (2011) confirmaron que la dosis de 4 mg kg^{-1} PC de EPC aplicada en una sola inyección es adecuada para inducir al desove a las hembras de esta especie.

Por su parte, Ibarra *et al.* (2004) indujeron el desove de *L. guttatus* utilizando implantes del análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa), con dosis de 25 ó 75 mg kg^{-1} PC. Ibarra-Castro & Duncan (2007) evaluaron implantes en pargos silvestres con 25, 50, 75 y 100 µg del análogo de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRHa) y determinaron que el implante de 75 µg fue el más efectivo para la liberación de los huevos. Ibarra-Castro & Alvarez-Lajonchère (2009) demostraron la eficiencia de los implantes de GnRHa tanto en pargos silvestres como de cautiverio y desarrollaron un monográfico para estimar la dosis requerida de GnRHa para la inducción al desove de hembras de pargo flamenco. Además, se ha demostrado que es posible obtener desoves espontáneos durante la época natural de desove, con peces adaptados a las condiciones de cautiverio propicias para su maduración y desove (Cano, 2003; Boza-Abarca *et al.*, 2008; Alvarez-Lajonchère *et al*., 2011; Ibarra-Castro & Alvarez-Lajonchère, 2011).

Fertilización

Una vez inducidas, las hembras se colocan en los tanques donde se efectúa la fertilización natural. Generalmente la proporción de machos:hembras es de 2:1. Los machos fecundan los huevos al momento de ser liberados por la hembra en el agua (Sierra de la Rosa, 2007; Boza-Abarca *et al*., 2008; Ibarra-Castro & Alvarez-Lajonchère 2009, 2011). Se han reportado diferentes porcentajes de fertilización, que varían según las condiciones de mantenimiento de los reproductores, de 45 a 90% (García-Ortega *et al*., 2005; Sierra de la

Rosa, 2007; Boza-Abarca *et al.*, 2008, 2011; Ibarra-Castro & Alvarez-Lajonchère, 2009, 2011; Herrera-Ulloa *et al*., 2009, 2010; Álvarez-Lajonchère *et al*., 2012).

Los huevos vivos fertilizados del pargo flamenco son pelágicos y flotan en la superficie del agua. Son de forma esférica, con corion transparente y liso lo que permite observar, mediante microscopio compuesto, el desarrollo embrionario. El espacio previtelino es pequeño; el diámetro es de 650 a 900 µm y el vitelo presenta una sola gota oleosa (Fig. 1a). Los huevos muertos son opacos y no flotan en la superficie del agua (Fig. 1b) (Ibarra-Castro & Duncan, 2007; Boza-Abarca *et al*., 2008; Alvarez-Lajonchère *et al*., 2011).

Manejo e incubación de huevos

La manipulación y la incubación de huevos de peces son procedimientos sencillos pero importantes para la producción masiva de juveniles; por lo cual, se han realizado diferentes estudios para establecer las mejores prácticas de manejo en *L. guttatus*. Ibarra-Castro *et al*. (2012b) realizaron un estudio para determinar el manejo más apropiado para la incubación de huevos. Evaluaron dos densidades de siembra (250 y 1000 huevos L^{-1}), con o sin tratamiento profiláctico de formalina a 10 mg L^{-1} por una hora antes de la incubación, colocándolos en tanques de fibra de vidrio de 100 L con y sin flujo de agua (renovando el 30% h^{-1}). Concluyeron que la mejor densidad de siembra para la incubación es de 250 huevos L^{-1} y no encontraron diferencias significativas en la eclosión de huevos con o sin tratamiento profiláctico, ni con o sin flujo de agua. En otro estudio, Ibarra-Castro *et al.* (2012c) recomiendan utilizar acriflavina a 5 mg L^{-1} como tratamiento profiláctico en la incubación de huevos de pargo flamenco para reducir los efectos negativos de microorganismos patógenos en huevos y larvas.

Por otro lado, las condiciones ambientales en la incubación de huevos de peces marinos juegan un papel preponderante en el desarrollo de los organismos; por ejemplo, se ha demostrado que el fotoperiodo influye en el desarrollo embrionario y tiempo de eclosión de las larvas (Helvik & Walter, 1992, 1993; Downing & Litvak, 2002). Duncan *et al.* (2008) evaluaron el efecto del fotoperiodo en la incubación de huevos de pargo flamenco y concluyeron que, independientemente del fotoperiodo, la mayoría de los huevos eclosionaron entre 17 y 20 h postfertilización (HPF); sin embargo, el periodo de eclosión aumentó significativamente (de 23 a 25 HPF) en los huevos incubados con luz constante.

Otro de los factores ambientales que influyen en los procesos vitales de los peces, es la salinidad del medio donde se cultivan; algunas investigaciones en especies de peces marinos mencionan que la incubación de huevos, fuera del rango de salinidad que tolera la especie, afecta el desarrollo embrionario, produce malformaciones, puede alargar el tiempo de eclosión y disminuir la supervivencia, tanto de embriones como de larvas eclosionadas (Henne & Watanabe, 2003; Jian *et al*., 2003; Berlinsky *et al*., 2004). Para el pargo flamenco, se demostró que la incubación de huevos puede efectuarse en salinidades de 15 a 40 sin afectar el desarrollo embrionario y la eclosión de larvas normales (Abdo de la Parra *et al*., 2011).

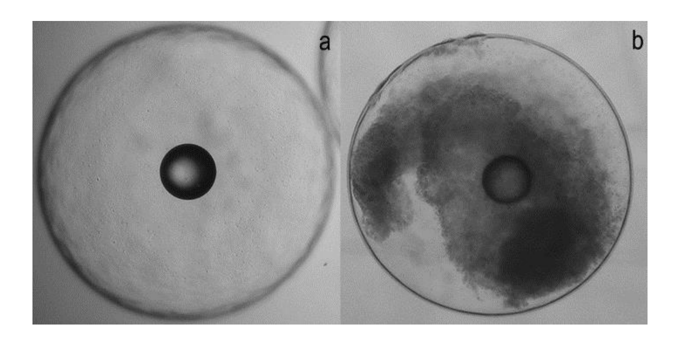


Figura 1. a) Huevo fertilizado viable de pargo flamenco, de forma esférica, con corion transparente y liso, evidenciando un espacio previtelino pequeño y donde el vitelo presenta una sola gota de aceite, b) huevo fertilizado no viable (Reproducida de Abdo de la Parra & Rodríguez-Ibarra, 2011).

Análisis financiero en la producción de huevos fertilizados

Ibarra-Castro *et al*. (2013), realizaron análisis financiero de un ciclo de producción de huevos de pargo flamenco a escala piloto, para evaluar la posibilidad de implementar esta tecnología a escala comercial. Los resultados determinaron que la mano de obra se llevó el 36% del costo total, seguida de los materiales e insumos (21%), alimento (11%) y por último, la depreciación que representó el 10% del total. El costo de 1.000 huevos viables ya empacados para su envío se estimó en US$0,96 y el costo de producción de 100.000 larvas de 48 h después de la eclosión (HDE) fue de US$2,045. De acuerdo a los resultados obtenidos, los autores mencionan que la tecnología de producción de huevos de esta especie puede extenderse a escala comercial, siguiendo sus recomendaciones.

Desarrollo embrionario y larvario

El desarrollo embrionario (Tabla 1) es similar a otras especies de pargo y fue descrito por Ibarra-Castro (2005). La eclosión se inicia entre las 15 y 17 HPF a temperaturas entre 26 y 30ºC, y termina en un periodo de 3-4 h. En condiciones normales de cultivo se obtienen porcentajes de eclosión mayores al 80% (García-Ortega *et al*., 2005; Ibarra-Castro, 2005; Ibarra

Tabla 1. Desarrollo embrionario del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Tomado de Ibarra-Castro (2005).

Horas post-fertilización (HPF)	Estado de desarrollo
0:15-0:30	división de 2 y 4 células
0:45-0:55	8 células
1:10-1:30	16 células
1:40-1:50	mórula
4:15-4:25	blástula
6:15-6:25	inicio del eje embrionario
7:15-7:25	evolución del embrión
8:15-8:25	segmentación del embrión
10:19	continúa segmentación hasta la cola y aparecen pigmentos
15:39	formación de la aleta caudal y aparición de órganos internos
16:44	empieza a latir el corazón y se observa movimiento del embrión
19:49	eclosión del embrión

& Duncan, 2007; Boza-Abarca *et al*., 2008; Duncan *et al*., 2008; Abdo de la Parra *et al*., 2010; Ibarra-Castro & Alvarez-Lajonchère, 2011; Ibarra-Castro *et al*., 2012a, 2012b).

Las larvas recién eclosionadas (Fig. 2) miden entre 2,1 y 2,7 mm de longitud total (LT) (García-Ortega *et al*., 2005; Boza-Abarca *et al*., 2008; Abdo de la Parra *et al*., 2010; Ibarra-Castro & Alvarez-Lajonchère, *et al*., 2011, 2012), el saco vitelino abarca casi la mitad de la longitud del cuerpo; el tubo digestivo, boca y poro anal se encuentran indiferenciados y no se distinguen; los ojos también están indiferenciados. Entre los días 0 y 1 después de la eclosión (DE), las larvas flotan en la columna de agua sin movimiento significativo y los ojos empiezan a desarrollarse. A los 3 días DE se observa la abertura del poro anal, boca y ojos se encuentran completamente pigmentados, el saco vitelino ha sido absorbido completamente y las larvas miden alrededor de 3,0 ± 0,02 mm de LT. A los 4 días DE se alimentan activamente en la columna de agua y en la superficie. La preflexión ocurre entre los días 14 y 16 DE; la flexión entre los días 19 y 20 DE y la post-flexión con posterioridad al día 26 DE, donde las larvas alcanzan alrededor de 9,3 ± 1,2 mm de LT (Boza-Abarca *et al*., 2008; Abdo de la Parra & Rodríguez-Ibarra, 2011).

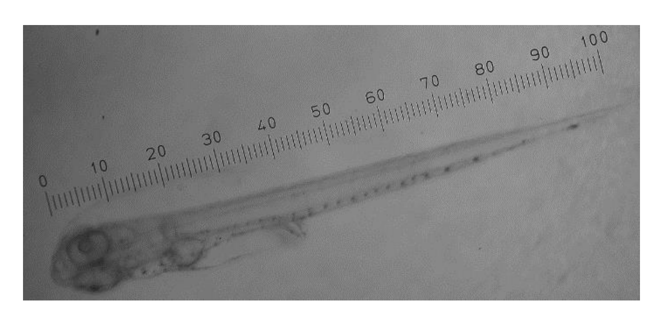


Figure 2. Larva de pargo flamenco *L. guttatus* recién eclosionada. El tubo digestivo, la boca, el poro anal y los ojos se encuentran indiferenciados; al eclosionar miden entre 2,1 a 2,7 mm de LT (Foto cortesía de Rodríguez-Ibarra, 2010). Cada unidad de la reglilla equivale a 0,020 mm).

Descripción del sistema digestivo

Galaviz *et al*. (2012), describieron el desarrollo del sistema digestivo de las larvas de pargo flamenco desde la eclosión hasta el día 40 DE. Señalan que al momento de la eclosión, el sistema digestivo se encuentra indiferenciado y aparece como un tubo recto, boca y ano no diferenciados todavía y el tracto digestivo está cerrado al exterior. Durante la absorción del saco vitelino (2-3 días DE) se empieza a diferenciar el rudimentario sistema digestivo en bucofaríngeo, esófago corto, intestino y glándulas accesorias digestivas (hígado y páncreas).

Entre los días 3 y 4 DE las larvas abren la boca (3,0 ± 0,02 mm LT) y el intestino posterior es separado del anterior por la válvula intestinal. A partir de la alimentación exógena y hasta el día 10 DE, el sistema digestivo aumenta en tamaño y complejidad. A los 20 días DE las glándulas gástricas se distinguen claramente, y a los 25 días DE el estómago está morfológicamente diferenciado, distinguiéndose tres regiones: cardias, fundus y píloro. La actividad de la tripsina se detectó al momento de la eclosión y fue aumentando conforme la larva se fue desarrollando y cambiando el tipo de alimento. La máxima actividad se detectó al día 35 DE, cuando la larva se alimentó con una dieta artificial. En base a estos resultados, los autores sugieren que el destete se puede efectuar entre los días 20 y 25 DE.

Larvicultura

Protocolos de alimentación

El primer reporte publicado sobre la larvicultura del pargo flamenco se realizó en las instalaciones del

CIAD, Unidad Mazatlán, Sinaloa por García-Ortega *et al.* (2005). En este estudio, se inocularon con una mezcla de *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis* sp. e *Isochrysis* sp. a 100.000 cel mL^{-1} a partir del primer día y hasta el día 14 DE. Las larvas se alimentaron con rotíferos *Brachionus rotundiformes* con 10 ind. mL^{-1} del primer día al día 23 DE. Posteriormente, a partir del día 24 DE se redujo la tasa de alimentación a 6 ind. mL^{-1} y se añadieron metanauplios de *Artemia* sp. enriquecida, a una densidad de 0,1 ind. mL^{-1}, la cual se fue incrementando gradualmente hasta 1 ind. mL^{-1}. El destete se inició al día 31 DE utilizando una dieta microparticulada a base de quistes descapsulados de *Artemia* y harina de pescado como fuentes de proteína (García-Ortega *et al.*, 2003). A los 41 días DE las larvas consumían solo alimento artificial. Los autores reportaron una tasa de supervivencia de 0,5%.

El protocolo anterior fue modificado (Fig. 3) en las mismas instalaciones por Abdo de la Parra *et al.* (2010), aumentando la cantidad de microalgas, rotíferos y nauplios de *Artemia* otorgada a las larvas de pargo. Además, a partir del día 2 al 15 DE se agregó a los tanques de cultivo, una mezcla de copépodos (*Tisbe monozota* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*) a una concentración de 0,5 ind mL^{-1}. El cambio a alimento inerte se realizó a partir de los 30 días DE, con una dieta comercial microparticulada (Lansy 2/4, 4/6, 5/8, 8/12, INVE Aquaculture Inc.). Los autores reportaron una tasa de supervivencia entre 1,5 a 2,8% al final del cultivo larvario (45 días DE) y los juveniles cosechados midieron alrededor de 4,5 cm de LT (Fig. 4).

Recientemente, Alvarez-Lajonchère *et al.* (2012) describieron la larvicultura del pargo flamenco a escala piloto, realizada en la planta piloto para la producción de peces marinos del CIAD, Unidad Mazatlán (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2007). El protocolo de alimentación fue similar al reportado por Abdo de la Parra *et al.* (2010), modificando la alimentación con metanauplios de *Artemia* enriquecidos durante 18 h con SuperSelco® (INVE Aquaculture Inc). Los autores obtuvieron una supervivencia de 12,1 ± 1,1% debido a que a partir de 28 días DE se inició la separación de tamaño para evitar el canibalismo, dado que durante la larvicultura de esta especie, se observó una gran dispersión de tamaños.

En la Estación de Biología Marina de Punta Arenas, Costa Rica se ha reportado una tasa de supervivencia de 1,5% de larvas de pargo flamenco a los 26 días DE, bajo el siguiente protocolo de alimentación; los tanques de larvicultura fueron inoculados con *Isochrysis galbana* (600.000 cel mL^{-1}), rotíferos *Brachionus plicatilis* (15-20 ind mL^{-1}), huevos de ostión fertilizados (*Crassostrea gigas*, 5 huevos mL^{-1}) y zooplancton prefiltrado del Golfo de Nicoya (<150 µm de tamaño) que contenía

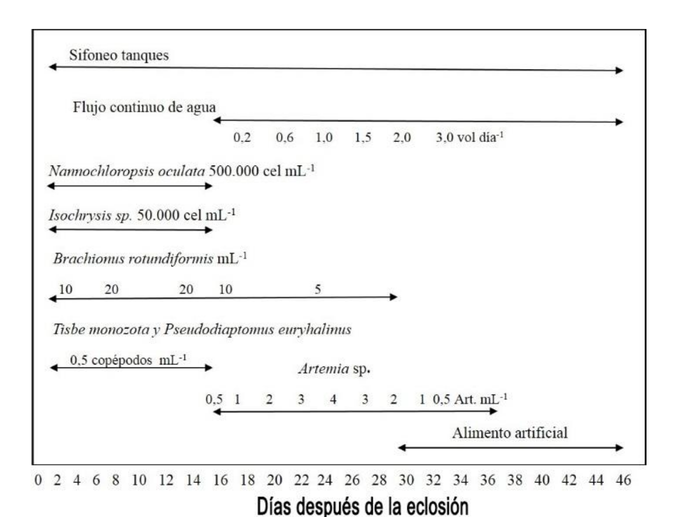


Figure 3. Protocolo de manejo de la calidad del agua y alimentación utilizado para la larvicultura del pargo flamenco *L. guttatus* durante 45 días DE (Reproducido de Abdo de la Parra *et al.*, 2010).

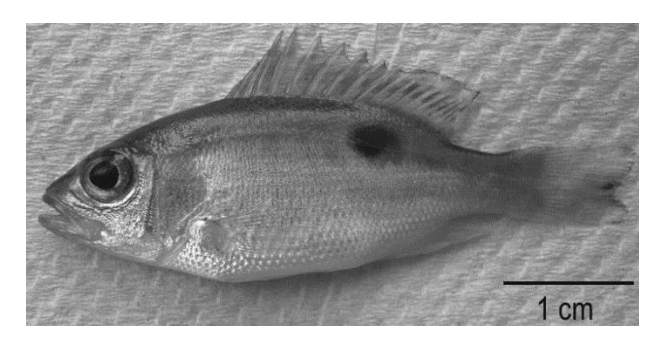


Figure 4. Juvenil de pargo flamenco *L. guttatus* de 4,5 cm de LT obtenido al final del cultivo larvario (45 días DE). (Reproducida de Abdo de la Parra & Rodríguez-Ibarra, 2011).

principalmente larvas de copépodos (5-10 ind mL^{-1}). Excepto los huevos de ostra fertilizados que se mantuvieron un sólo día, las densidades de *Isochrisys galbana*, rotíferos, y zooplancton se mantuvieron hasta los 27, 29 y 35 días DE, respectivamente. A 16 días DE se inició la alimentación con nauplios de *Artemia* (3-5 nauplios mL^{-1}) hasta 36 días DE; las larvas aceptaron la sardina fresca como alimento a 31 días DE y el destete se realizó mezclando alimento fresco con alimento inerte (Boza-Abarca *et al.*, 2008).

Por otro lado, la Universidad Nacional (UNA) de Costa Rica transfirió la biotecnología de acuicultura al Parque Marino del Pacífico y unieron esfuerzos para desarrollar el cultivo del pargo flamenco en el país. La larvicultura se efectuó aplicando de 2 a 20 DE, 500 L diarios de *Tetraselmis chui* con densidades entre 100 y 200 cel mL^{-1} y rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) enriquecidos con Rotimac® (Bio-Marine Inc.) entre 5

y 20 ind mL^{-1}. A partir de los días 15 y 30 DE se aplicaron nauplios de *Artemia* (1 ind mL^{-1}) y a partir del día 25 DE se otorgó *Artemia* adulta a razón de 2 ind larva día^{-1}. El período de destete inició entre los 30 y 32 días DE otorgando una mezcla de alimento fresco basado en camarón y pescado. Los autores mencionan que los procesos de producción de larvas fueron optimizados durante los primeros años de la investigación en función de obtener un protocolo de alimentación que permitiese la supervivencia de las larvas; así, de 10.000 alevines producidos al inicio pasaron a producir cerca de 70.000. Los resultados encontrados refuerzan el potencial de la producción en laboratorio de la especie (Herrera-Ulloa *et al*., 2009, 2010).

En Colombia, CENIACUA y la compañía camaronera C.I. Balboa S.A. unieron esfuerzos, para verificar el potencial del pargo flamenco como especie candidata para la diversificación de la maricultura en el Pacífico colombiano y desarrollaron el siguiente protocolo de alimentación en tanques de concreto de 10.000 L. A partir del día 3 DE suministraron microalgas (*Nannochloropsis oculata*), rotíferos enriquecidos (10-15 ind mL^{-1}), *Artemia salina* enriquecida (5 ind mL^{-1}) con HUFA'S (DHA Protein SELCO®, INVE Aquaculture Inc.) y zooplancton silvestre. Del día 6 al 20 DE se otorgó una solución nutritiva sin diluir, el Epac® tamizado a 100 μm (alimento microparticulado), mientras que entre los días 19 y 33 DE se aplicó en su tamaño original (500 μm alimento particulado) conjuntamente con zooplancton silvestre y nauplios de *Artemia*. Posteriormente, se utilizó alimento balanceado para camarón (alimento particulado 2 y 3) acompañado de juveniles y adultos de *A. salina* enriquecidos con SELCO® (INVE Aquaculture Inc.). A los 42 días DE los alevines se alimentaron únicamente a base de dietas comerciales. Durante las dos últimas semanas de la larvicultura se observó un acentuado canibalismo debido a la diferencia de tallas de los peces, lo cual afectó la supervivencia final (1,8%), por lo que recomiendan una separación de tallas a partir de 30 días DE (Sierra de la Rosa, 2007).

Por su parte, Velasco-Blanco *et al*. (2013) evaluaron tres productos comerciales, S-Presso® (INVE Aquaculture Inc.), DHA Protein Selco® (INVE Aquaculture Inc.) y Rotigrow Plus® (Reed Mariculture Inc.) para enriquecer el alimento vivo utilizado para alimentar larvas de pargo flamenco durante el cultivo larvario y mencionan que no encontraron diferencias significativas en crecimiento y supervivencia de las larvas de los tres tratamientos; sin embargo, recomiendan utilizar Rotigrow-Plus® por ser el más económico de los tres productos evaluados.

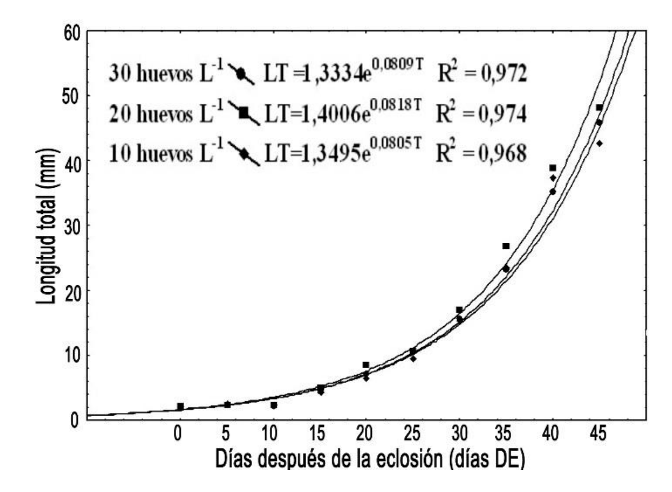


Figura 5. Curvas de crecimiento basadas en LT de larvas de pargo flamenco *L. guttatus*, cultivadas a diferentes densidades de siembra durante 45 días DE (reproducido de Abdo de la Parra *et al*., 2010).

Densidad de siembra

Durante la larvicultura de peces marinos existen muchos factores que influyen sobre el crecimiento y la supervivencia; uno de ellos es la densidad de siembra de huevos o larvas, que puede afectar la calidad del agua, limitar el espacio y aumentar la agresividad de las larvas (Sakakura & Tsukamoto, 2002; Szkudlarek & Zakés, 2007). Abdo de la Parra *et al*. (2010) evaluaron el efecto de la densidad de siembra (30, 20 y 10 huevos L^{-1}) en la larvicultura del pargo flamenco y concluyeron que la densidad de siembra inicial no afectó el crecimiento (Fig. 5) ni la supervivencia de las larvas, por lo que mencionan que el cultivo larvario de *L. guttatus* puede efectuarse sembrando 30 huevos L^{-1}; sin embargo, recomiendan realizar más estudios para evaluar mayores densidades de siembra en la larvicultura de esta especie y aumentar la producción de juveniles.

CONCLUSIONES

La presente revisión demuestra que el pargo flamenco *L. guttatus* es una especie con alto potencial para diversificar la maricultura en los países con litoral del Pacífico donde se encuentra naturalmente. Se comprobó que los reproductores maduran y se reproducen en cautiverio por inducción hormonal y/o dándoles las condiciones medioambientales para tal efecto. En el CIAD, Unidad Mazatlán, el ciclo reproductivo se ha cerrado y se cuenta con organismos F1 y F2 que forman parte del lote actual de reproductores de la planta piloto para la producción de peces marinos de la Unidad. La tasa de fertilización es alta cuando se dan las condi-

ciones adecuadas; así como el porcentaje de eclosión. Se han determinado algunos de los parámetros adecuados para su cultivo larvario como: fotoperiodo y salinidad de incubación, protocolos de alimentación, densidad de siembra, etc., mejorando con ello los protocolos de cultivo larvario. Uno de los grandes logros hasta la fecha ha sido elevar la supervivencia de las larvas al final del cultivo (45 días DE) de 1,5 a 12.0% a escala piloto; por lo que será factible producir, en un futuro cercano, de manera confiable y continua, juveniles de pargo flamenco en laboratorio para realizar su engorda en jaulas y detonar el crecimiento de esta industria en Latinoamérica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica de Manuel Cruz, Juan Huerta, Armando Ibarra, Jesús Tirado y Rosendo Valdivia. A Valerie Williams por la traducción del resumen y corrección del manuscrito. Esta investigación fue financiada por FORDECyT 173714, bajo la responsabilidad de M.I. Abdo de la Parra.

REFERENCIAS

Abdo de la Parra, M.I. & L.E. Rodríguez-Ibarra. 2011. Cultivo larvario y requerimientos nutricionales del pargo flamenco. Editorial Académica Española, Berlín, 64 pp.

Abdo de la Parra, M.I., L.E. Rodríguez-Ibarra, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar & B. González-Rodríguez. 2011. Evaluación del efecto de diferentes salinidades sobre la incubación de huevos y eclosión de larvas del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. Cienc. Pesq., 19(1): 29-34.

Abdo de la Parra, M.I., L.E. Rodríguez-Ibarra, F. Campillo-Martínez, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar, L. Álvarez-Lajonchère & D. Voltolina. 2010. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (*S*teindachner, 1869). Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 45(1): 141-146.

Álvarez-Lajonchère, L., L. Ibarra-Castro & N. García-Aguilar. 2011. Reproducción controlada. In: L.S. Álvarez-Lajonchère & A. Puello-Cruz (eds.). El pargo flamenco: *Lutjanus guttatus*. Producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Clave Editorial, México, pp. 25-58.

Álvarez-Lajonchère, L., M.A. Reina-Cañez, M.A. Camacho-Hernández & S. Kraul. 2007. Design of a pilot-scale tropical marine finfish hatchery for a research center at Mazatlán, México. Aquacult. Eng., 36: 81-96.

Álvarez-Lajonchère, L.S., M.I. Abdo de la Parra, L.E. Rodríguez-Ibarra, G. Velasco-Blanco, A. Puello-Cruz, B. González-Rodríguez, A. Ibarra-Soto & L. Ibarra-Castro. 2012. The scale-up of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, larval rearing at Mazatlan, Mexico. JWAS, 43(3): 411-422.

Arellano-Martínez, M., A. Rojas-Herrera, F. García-Domínguez, B. Caballos-Vázquez & M. Villarejo-Fuerte. 2001. Ciclo reproductivo del pargo lunajero *Lutjanus guttatus* (Steindachner 1869) en las costas de Guerrero, México. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 36: 1-8.

Benetti, D. & M. Feeley. 1999. The capture, transport, handling, prophylaxis, quarantine, and sampling of broodstock marine fish. World Aquacult., 30(3): 54-57.

Benetti, D. & E. Wilson. 1996. Estado actual y perspectivas del cultivo de peces marinos en el Ecuador. In: A. Silva & G. Merino (eds.). Acuicultura en Latinoamérica. IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura. 2º Simposio Avances y Perspectivas de la Acuacultura en Chile. Coquimbo, pp. 5-14.

Berlinsky, D.L., J. Taylor, R.A. Howell, T. Bradley & T.J. Smith. 2004. The effects of temperature and salinity on early life stages of black sea bass *Centropristis striata*. JWAS, 35(3): 335-344.

Boza-Abarca, J., E. Calvo-Vargas, N. Solís-Ortiz & J. Komen. 2008. Induced spawning and larval rearing of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at the Marine Biology Station, Puntarenas, Costa Rica. Cienc. Mar., 34: 239-252.

Boza-Abarca, J., S. Valverde-Chavarría, E. Calvo-Vargas, M. Ramírez-Alvarado & E. Rodríguez-Gómez. 2011. Inducción hormonal con suspensión de pituitaria de carpa y gonadotropina coriónica humana en el pargo manchado *Lutjanus guttatus* silvestre y criado en cautiverio. Cienc. Mar., 37(2): 125-139.

Bromage, N. 1995. Broodstock management and seed quality-general considerations. In: N.R. Bromage & R.J. Roberts (eds.). Broodstock management, egg, and larval quality. Blackwell Science, Oxford, pp. 1-24.

Cano, A. 2003. Reproduction in captivity and cultivation of the Pacific rose spotted snapper *Lutjanus guttatus* in the Republic of Panama. World Aquaculture 2003. Procedings WAS, pp. 153.

Cruz-Romero, M., E.A. Chávez, E. Espino & A. Garcia. 1996. Assessment of a snapper complex (*Lutjanus* spp.) of the eastern tropical Pacific. In: F. Arreguín-Sánchez, J.L. Munro, M.C. Balgos & D. Pauly (eds.). Biology and culture of tropical groupers and snappers. ICLARM Conf. Proc., 48: 331-337.

Downing, G. & M.K. Litvak. 2002. Effects of light intensity, spectral composition and photoperiod on development and hatching of haddock (*Melano*-

grammus aeglecnus) embryos. Aquaculture, 213: 265-278.

Duncan, J.N, L. Ibarra-Castro & R. Álvarez-Villaseñor. 2008. Effect of the dusk photoperiod change from light to dark on the incubation period of eggs of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner). Aquacult. Res., 39: 427-433.

Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter & V.H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental, Volumen II Vertebrados-Parte 1. FAO, Roma, 646 pp.

Galaviz, M.A., A. García-Ortega, E. Gisbert, L.M. López & A. García-Gasca. 2012. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus.* Comp. Biochem. Physiol. Part B, 161: 9-16.

García-Ortega, A., I. Abdo de la Parra & C. Hernández. 2003. Waning of bulls eye puffer (*Sphoeroides annulatus*) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal. Aquacult. Int., 11: 183-194.

García-Ortega, A., I. Abdo de la Parra, N. Duncan, E. Rodríguez-Ibarra, G. Velasco, B. González-Rodríguez, A. Puello-Cruz & I. Martínez-Rodríguez. 2005. Larval rearing of spotted rose snapper *Lutjanus gututtus* under experimental conditions. In: C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Willey & P. Sorgeloos (eds.). Larvi fish and shellfish larviculture Symposium EAS. Pubn. 36. Bélgica, pp. 172-175.

Helvik, J.V. & B.T. Walther. 1992. Photo-regulation of the hatching process of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) embryos. J. Exp. Zool., 263: 204-209.

Helvik, J.V. & B.T. Walther. 1993. Development of hatchability in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs. Int. J. Dev. Biol., 37(3): 487-490.

Henne, J.P. & W.O. Watanabe. 2003. Effects of light intensity and salinity on growth, survival, and whole-body osmolality of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma.* JWAS, 34(4): 450-465.

Herrera-Ulloa, A., J. Chacón-Guzmán, G. Zúñiga-Calero & R. Jiménez-Montealegre. 2010. Spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) aquaculture research and development as socio-economic alternative for Costa Rican fisheries communities. World Aquacult., 41: 20-22.

Herrera-Ulloa, A., J. Chacón-Guzmán, G. Zúñiga-Calero, O. Fajardo & R. Jiménez-Montealegre. 2009. Acuicultura de pargo la mancha *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en Costa Rica dentro de un enfoque ecosistémico Rev. Mar. Cost., 1: 197-213.

Ibarra, L., S. Dumas & N. Duncan. 2004. Gonad development and LHRHa-induced spawning in female spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. In: 5th International Symposium on Fish Endocrinology, 5-9 September, Castellón, pp. 1.

Ibarra-Castro, L. 2005. Desarrollo gonadal e inducción a la maduración final de *Lutjanus guttatus* silvestres y de cautiverio por implante e inyección de la hormona LHRHa. Tesis de Maestría en Ciencias. CIAD, Unidad Mazatlán, Mazatlán, 160 pp.

Ibarra-Castro, L. & L. Alvarez-Lajonchère. 2009. An improved induced-spawning protocol for spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Isr. J. Aquacult. Bamidgeh, 61: 121-133.

Ibarra-Castro, L. & L. Alvarez-Lajonchère. 2011. GnRHa induced multiple spawns and volition spawning of captive spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, at Mazatlan, Mexico. JWAS, 42: 564-574.

Ibarra-Castro, L. & N. Duncan. 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Aquaculture, 272: 737-746.

Ibarra-Castro, L., F.J. Martínez-Cordero & L. Alvarez-Lajonchère. 2013. Financial analysis of pilot-scale egg production of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus.* Aquacult. Econ. & Manage., 17(2): 171-183.

Ibarra-Castro, L., L.E. Muñoz-Meza & L. Álvarez-Lajonchère. 2012b. Estudios sobre el manejo e incubación de huevos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Pisces, Lutjanidae). Hidrobiología, 22(1): 49-57.

Ibarra-Castro, L., C.R. Lizárraga-Osuna, B. Gómez-Gill & L. Alvarez-Lajonchère. 2012c. Tratamientos profilácticos para desinfectar la superficie de huevos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus.* Rev. Bio. Mar. Oceanogr., 47(1): 155-160.

Ibarra-Castro, L., L. Alvarez-Lajonchère, N. García-Aguilar, M.I. Abdo de la Parra & L.E. Rodríguez-Ibarra. 2012a. Generation cycle closure of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, in captivity. Rev. Bio. Mar. Oceanogr., 47(2): 333-337.

Jian, C.J., S.Y. Cheng & J.C. Chen. 2003. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*, at different salinity and temperature levels. Aquacult. Res., 34: 175-185.

Rojas, J.R. 1997. Fecundidad y época de reproducción del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 44/45: 477-487.

Sakakura, Y. & K. Tsukamoto. 2002. Onset and development of aggressive behaviour in the early life stage of Japanese flounder. Fish Sci., 68: 854-861.

Sierra-De la Rosa, J.F. 2007. Inducción hormonal (HCG) al desove y larvicultura del pargo lunarejo *Lutjanus*

guttatus como alternativa de diversificación para la maricultura en el Pacífico Colombiano. Rev. Electrón. Ing. Produc. Acuicult., 2: 47-60.

Szkudlarek, M. & Z. Zake. 2007. Effect of stocking density on survival and growth performance of pikeperch, S*ander lucioperca* larvae under controlled conditions Aquacult. Int., 15: 67-81.

Tucker, J.W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, 750 pp.

Valverde, S. & J. Boza 1999. Inducción al desove en hembras del pargo mancha, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Uniciencia, 15-16: 65-69.

Received: 16 May 2014; Accepted: 27 February 2015

Velasco-Blanco, G., J.F. Arias-Rodríguez, M.I. Abdo-de la Parra, L. Ibarra-Castro, L.E. Rodríguez-Ibarra & N. García-Aguilar. 2013. Enriquecimiento de rotíferos y *Artemia* con diferentes fuentes de DHA/EPA, para alimentar larvas de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque, M. Tapia-Salazar, M.G. Nieto-López, D. Villarreal, J. Gamboa & C.A. Álvarez. XII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Villahermosa, 88 pp.

Zohar, Y. & C.C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99-136.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 424-434, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-4

Review

El bagre de canal (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818): estado actual y problemática en México

Ana Laura Lara-Rivera[1], Gaspar Manuel Parra-Bracamonte[1], Ana María Sifuentes-Rincón[1] Héctor Hugo Gojón-Báez[2], Hervey Rodríguez-González[3] & Isidro Otoniel Montelongo-Alfaro[4]
[1]Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México
[2]Comité Sistema Producto Bagre de Tamaulipas A.C. Victoria, Tamaulipas, México
[3]Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa Instituto Politécnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México
[4]Universidad Tecnológica del Mar Tamaulipas Bicentenario. La Pesca, Soto la Marina Tamaulipas, México
Corresponding author: Gaspar Manuel Parra-Bracamonte (gparra@ipn.mx)

RESUMEN. El bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) es uno de los peces endémicos de Norte América con mayor potencial para la acuicultura. A pesar de esto, los datos sobre su distribución actual son escasos y se desconocen muchos aspectos de su dinámica y desempeño productivo. En el presente estudio se reportan los resultados de una búsqueda bibliográfica y análisis de campo que permiten describir la situación actual del bagre de canal con respecto a su distribución geográfica histórica y actual, así como de la problemática que enfrentan los sistemas productivos de esta especie en México. Se identificó la falta de información e indicadores que permitan conocer la extensión de su hábitat natural, movilización o potencial productivo. La calidad y disponibilidad del agua figuran entre las principales problemáticas de la industria; el alimento supone el mayor gasto para los productores y existe gran heterogeneidad de manejo tanto en granjas reproductoras como de engorde, gran parte de la dinámica productiva sigue un modelo de ensayo y error. Se requiere optimizar y homologar los procesos del sistema productivo de bagre de canal, así como caracterizar correctamente las poblaciones domésticas y silvestres para aprovechar al máximo su potencial.

Palabras clave: *Ictalurus punctatus*, sistemas de producción acuícola, acuicultura, México.

Channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818): current status and problematic situation in Mexico

ABSTRACT. Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is one of the endemic fishes of North America with the greatest potential for aquaculture. Despite this, data of its current distribution is scare and many aspects of its dynamic and productive performance remain unknown. In the present study, results are reported from a literature search and field analysis for describing the current status of channel catfish in Mexico regarding its historical and current geographical distribution as well as the problems faced by fish farmers and production systems. We were able to identify a lack of information and indicators to properly assess the extent of the species natural habitat and its productive potential. The quality and availability of water are among the main problems of the industry. Food costs represent the larger cost-loss for producers and there is great heterogeneity on the management of both breeding and production farms. Much of the production dynamics follows a pattern of trial and error. It became clear the need to optimize and standardize the processes on the channel catfish production system and to properly characterize domestic and wild populations to maximize their potential.

Keywords: *Ictalurus punctatus*, aquatic production systems, aquaculture, Mexico.

Corresponding editor: Diego Giberto

INTRODUCCIÓN

El continente americano posee casi el 50% de la diversidad de especies de agua dulce del mundo (Levêque *et al.,* 2008). El bagre de canal (*Ictalurus punctatus)* es un pez dulceacuícola nativo de Estados Unidos, Canadá y noreste de México (Jordan, 1896; Jackson, 2004), con un potencial económico que se ve reflejado en el aumento en la producción mundial de 100.000 a 500.000 ton anuales en las últimas once décadas (ONU, 2014).

A pesar de su relevancia, existe escasa información sobre la dinámica de las poblaciones endémicas y domésticas de esta especie en México. Los primeros reportes sobre el bagre en el territorio mexicano datan de hace varias décadas y describen principalmente la distribución geográfica de la especie en el país. Conocer la distribución actual de la especie permite reconocer patrones de dispersión de la especie, identificarla como nativa o exótica y determinar su impacto potencial sobre distintos ecosistemas. Además, evaluar su desempeño productivo bajo diferentes esquemas o hábitats podría generar información que permita optimizar su aprovechamiento. Adicionalmente, la caracterización genética de las poblaciones de bagre de canal en México podría generar información valiosa sobre la calidad de las líneas usadas en la acuicultura, sus orígenes y la identidad de productos y subproductos de bagre comercializados en el país.

El objetivo del presente estudio consistió en analizar, mediante una extensa búsqueda bibliográfica y análisis de campo, la situación actual del bagre de canal en México en referencia a su distribución geográfica y la problemática que enfrenta la acuicultura de esta especie en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ocurrencia de peces ictalúridos

Para recopilar información sobre los antecedentes de ocurrencia, avistamientos en el país, producción acuícola y pesquera, y reportes de importación de bagre de canal en México, se efectuó una investigación en literatura y bases de datos oficiales. En México, la SAGARPA (2013) y CONAPESCA (2014) proveen información sobre producción en volumen, tipo de pesca, localización, estadísticas históricas y centros de producción federales, mientras que la FAO (ONU, 2014) provee información sobre los países que producen bagre a nivel mundial y el volumen correspondiente a pesca y acuicultura. Se consultaron publicaciones científicas que contienen principalmente reportes sobre avistamientos en el país y las primeras importaciones de bagre de canal para la acuicultura. Se utilizó literatura gris, consistente en tesis de nivel licenciatura y posgrado con resultados de investigación científica, pero que no han sido publicados, como referencia para detectar la presencia de bagre de canal en diferentes sitios del país. La consulta de sitios de internet, como blogs de pesca deportiva y anuncios clasificados también permitió ubicar al bagre de canal en diversos estados en el país. La comunicación personal con los productores y pescadores mexicanos hizo posible identificar organismos en presas y ríos donde no existían reportes previos. Adicionalmente, se colocaron trampas en ríos y presas para determinar la presencia del bagre de canal en dichos cuerpos de agua.

Sistema productivo del bagre de canal

Se utilizó un análisis descriptivo en base a encuestas para obtener información sobre el sistema productivo de bagre de canal en México. Se diseñaron encuestas para analizar las dos modalidades de cultivo de la especie en el país: producción de crías y engorde. En el estudio participaron 24 de las granjas acuícolas privadas, estatales y federales más representativas del país, ya sea por su volumen de producción o participación en el mercado nacional mediante alevines o peces de talla comercial.

Las encuestas fueron elaboradas para incluir el mayor número de aspectos posibles sobre la acuicultura del bagre de canal y obtener datos sobre las prácticas cotidianas en los centros acuícolas; origen de los individuos, comercialización a distintas escalas, gestión de residuos y costos de producción, entre otros, así como identificar las tendencias y problemáticas de su cultivo en México.

RESULTADOS

Presencia de peces ictalúridos en México

El bagre de canal es un integrante de la familia *Ictaluridae*, del orden de los siluriformes, que comprende 478 géneros, 36 familias y al menos 7.000 especies (Follet, 1960). En aguas mexicanas, la familia está representada por varias especies (Tabla 1). Antes del presente reporte, existían 189 registros de avistamientos de bagres silvestres en en el país (Follet, 1960) (Tabla 2). El bajo Río Bravo, en la frontera norte del país, también está reportado como zona nativa de distribución de la especie y sería factible considerar sus ríos tributarios como el Conchos (Chihuahua), Salado (Coahuila y Nuevo León) y San Juan (Nuevo León), como posibles hábitats de la especie.

Tabla 1. Distribución nativa de especies de bagre en México.

Nombre científico	Nombre común	Distribución (Avistamientos reportados)	Taxonomía adicional
Ictalurus punctatus	Bagre de canal	Río Bravo, Río Conchos, Río Pánuco, Río Tuxpan/Pantepec (Page & Burr, 1991, Pérez-Ponce de León & Choudhury, 2002)	*Silurus punctatus*
Ictalurus furcatus	Bagre azul	Río Pánuco, Tamesí, Soto La Marina y Yaqui (Cuvier & Valenciennes, 1828), Río Bravo, Río Tuxtepec (Pérez-Ponce de León & Choudhury, 2002)	*Pimelodus furcatus, Pimelodus affinis, Amiurus meridionalis, Amiurus pondersosus*
Ictalurus mexicanus	Bagre del Pánuco	Río Pánuco, Río Valles (Miller *et al.*, 2005)	*Amiurus mexicanus*
Ictalurus melas	Bagre cabeza de toro	Río Bravo (Page & Burr, 1991)	*Ameiurus melas*
Ictalurus lupus[2]	Bagre lobo	Río Bravo y Soto La Marina (Girard, 1858), Cuatro Ciénegas, Río Pesquerías, Río Soto La Marina (Pérez-Ponce de León & Choudhury, 2002)	*Pimelodus lupus*
Ictalurus balsanus	Bagre del balsas	Río Balsas y Río Ixtla (Morelos, Guerrero y Michoacán) (Jordan & Snyder, 1900)	*Istialurus balsanus*
Ictalurus dugesii	Negro del Lerma	Río Lerma, Santiago, Ameca, Armería, Turbio y Lago de Chapala (Jordan & Evermann, 1896)	*Ameiurus dugesii*
Ictalurus ochoteranai[1]	Bagre de Chapala	Isla Patos, B.C. (De Buen, 1940)	*Haustor ochoterenai*
Ictalurus pricei	Bagre del Yaqui	Río Yaqui, Río Mayo, Río Casas y Río Fuerte (Rutter, 1986)	*Villarius pricei, Amiurus meeki*
Ictalurus australis[3]	Bagre del Pánuco	Río Forlón (Minckley *et al.*, 1986)	*Amiurus australis*

[1]Especie descrita como válida en Lundberg (1992), pero como sinónima de *I. dugesii* en Álvarez (1966) y Miller *et al.* (1986). [2]Miller *et al.* (2005) distinguen dos formas de *I. lupus*, pero no existen referencias de la descripción de esta segunda forma. [3]Dos especies reciben el nombre de "Bagre del Pánuco", sin embargo fueron reportadas como diferentes en Espinosa-Pérez *et al.* (1993).

Actualmente, se producen crías de bagre de canal en dos centros acuícolas federales: "La Boquilla" en Chihuahua y "La Rosa" en Coahuila (SAGARPA, 2013). Las crías producidas en estos centros se distribuyen para su engorda a productores de todo el país, mientras que cierto número de organismos se destina para la repoblación de presas. Las represas Vicente Guerrero y Falcón en Tamaulipas, si bien no han sido objeto de "siembras", sí son utilizadas para engordar peces en jaulas flotantes y el escape de los organismos, debido principalmente a incidencias medioambientales (*i.e.*, huracanes), supone la liberación de toneladas de peces a los embalses (Tabla 2). Los centros acuícolas privados más importantes se encuentran en los estados de Michoacán y Tamaulipas.

Como consecuencia de la pesca en represas, engorda en jaulas o producción en estanques, el bagre de canal se ha esparcido a lo largo del territorio nacional mexicano y actualmente se reporta su cultivo en los estados de Durango, Baja California, Colima, Estado de Mexico, Guanajuato, Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Aguascalientes, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Nuevo León, Morelos, Morelos y Veracruz (Tabla 3).

La dinámica de bagre de canal y su situación actual no podrían entenderse sin la referencia de los movimientos de introducción y movilización a los que ha estado sujeto. Sin embargo, es complicado establecer los antecedentes debido a que son escasos los eventos reportados de manera oficial. La primera introducción oficial de bagre de canal a México, ocurrió entre 1976 y 1981 mediante 800 pares de reproductores provenientes de Estados Unidos para su cría en Tamaulipas con fines comerciales (Miller, 2005), aunque existe un reporte (Follet, 1960) sobre peces que fueron liberados probablemente en los ríos Yaqui en Sonora, Casas Grandes en Chihuahua y Elota en Sinaloa. El reporte más reciente sobre la importación oficial de bagre de canal data de 2010 (Parra-Bracamonte *et al.*, 2010), donde se describe la introducción oficial de una línea de peces seleccionados para crecimiento procedentes de San Luis Missouri, (USA), hacia los centros acuícolas federales de Coahuila y Chihuaha. No existen registros oficiales de movilizaciones posteriores de peces, pero se sabe que los productores a nivel nacional acostumbran comprar, vender e intercambiar reproductores y crías entre ellos, en un intento empírico de aumentar la productividad de sus granjas por medio de la variabilidad genética.

Con respecto a la distribución actual de bagre de canal, en algunos casos, existe información sobre su origen, problemáticas y particularidades relacionadas con la actividad acuícola en los distintos estados (Tabla 4). Estos reportes comprenden la presencia de bagre en

Tabla 2. Avistamientos de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) en ríos mexicanos.

Estado	Sitio de avistamiento
Baja California	Río Colorado, Río Hardy, Presa Emilio López Zamora (Ruiz-Campos, 1995) y Río Mayor (Follet, 1960).
Sonora	Río Yaqui y Canal Welton-Mohawk (Follet, 1960).
Sinaloa	Río Fuerte, Río San Lorenzo, Río Humaya, Río Sinaloa, puente Dren Pericos (Ruiz-Campos, 1995; Hendrickson, 1984).
Tamaulipas	Río Pilón, Río Purificación, Río Corona, Río Soto La Marina (Miller & Smith, 1986).
Veracruz	Río Cazones, Río Pánuco (Follet, 1960).

Tabla 3. Presas mexicanas reportadas como hábitat de bagre de canal. *La presa La Lajilla se alimenta de agua de la Sierra Madre Oriental.

Presa	Río(s)	Estado
Vicente Guerrero	Purificación y Corona	Tamaulipas
Falcón	Bajo Bravo	Tamaulipas
La Boquilla	Conchos	Chihuahua
Gustavo Díaz Ordaz	Sinaloa	Sinaloa
Lázaro Cárdenas	Sextín y Ramos	Durango
La Lajilla	*	San Luis Potosí
José López Portillo	Pablillo y Camacho	Nuevo León
Rodrigo Gómez	San Juan	Nuevo León
Presa el Cuchillo-Solidaridad	San Juan	Nuevo León
Álvaro Obregón	Yaqui	Sonora
Lázaro Cárdenas	Bavispe y Yaqui	Sonora
Adolfo Ruiz Cortines	Mayo	Sonora

relación con la acuicultura, pudiendo derivar en el escape de los organismos cultivados hacia nuevos hábitats. Adicionalmente, se encontraron reportes sobre la introducción o producción de bagre de canal en los estados de Guerrero, Durango, Chiapas y Nayarit, sin embargo, no existen datos oficiales sobre la productividad de los mismos.

El Estado de Tamaulipas posee las condiciones climatológicas ideales para el cultivo del bagre de canal; inviernos fríos y cambios de temperatura que fomentan la maduración de las gónadas en los peces, además de ríos, presas y canales de riego disponibles para la acuicultura (González *et al.*, 2014). Actualmente, se encuentran registradas 7 granjas reproductoras de bagre de canal en el Estado de Tamaulipas, mientras que 22 unidades reportan la engorda del recurso en 664 jaulas flotantes en presas, ríos, estanques rústicos, semirústicos y circulares que le permiten ser el principal productor de bagre de canal en el país con más del 50% de la producción nacional.

Sistemas productivos de bagre de canal

El cultivo de bagre de canal se inició de manera intensiva en la década de 1970, cuando en Estados Unidos se optimizaron las técnicas utilizadas en la actualidad. Sin embargo, de acuerdo a los datos de campo obtenidos en este trabajo, los productores mexicanos se han visto obligados a experimentar constantemente en sus unidades de producción, a objeto de acumular experiencia de los éxitos y fracasos en su manejo. La problemática puede verse generalizada entre productores nacionales, pero existen dificultades específicas dependientes del objetivo del sistema productivo ya sea cría o engorde (Tablas 5-7).

La producción constante de crías a lo largo del año para abastecer a los productores es clave en la industria productora de bagre de canal en el país. Por lo tanto, un análisis detallado de las virtudes y desventajas del sistema puede ser una herramienta muy útil en el manejo futuro del recurso. Los productores mexicanos de bagre de canal dedicados a su reproducción utilizan entre 2 y 120 ha dedicadas casi equitativamente a las modalidades intensiva y extensiva. La actividad económica emplea ~200 personas en las granjas adscritas a la investigación, en su mayoría hombres, siendo las mujeres requeridas específicamente durante la temporada de reproducción. Los productores entrevistados mencionaron que su prioridad es tener peces más fértiles. La mayor parte de los peces usados como pie de cría es de origen nacional, sin embargo, es tam-

Tabla 4. Ocurrencia de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) en México.

Estado	Actividad Económica		Origen de los organismos	Mercado	Observaciones
	Acuicultura	Pesca			
Michoacán	Estanques rústicos y semirústicos	No hay reportes	Tamaulipas: granjas reproductoras y pescadores	Venta de pescado cocinado en restaurantes adyacentes a las granjas. Distribuyen a Jalisco, Morelos, México D.F.	Productores de crías para abastecimiento local y nacional
Jalisco	Estanques rústicos y semirústicos. Jaulas flotantes	Lago de Chapala	Tamaulipas y Michoacán	Local. En pescaderías, se exhiben peces vivos. Existen restaurantes anexos a las granjas más importantes	El Centro Acuícola Estatal produce crías para el abastecimiento local
Coahuila	Centro Acuícola Federal "La Rosa"		Líneas importadas de USA	Productores nacionales	381.045.000 crías producidas en 2013
Chihuahua	Centro Acuícola Federal "La Boquilla"	Presa La Boquilla	Tamaulipas y Coahuila	Productores nacionales	-
Nuevo León	Jaulas flotantes	Presas Rodrigo Gómez Santiago y José L. Portillo Lago El Charal	Tamaulipas y Coahuila (4.000 alevines introducidos a la Presa La Boca de origen desconocido)	Pie de granja; vivo para repoblar presas privadas, pescaderías en Linares, Montemorelos, Abasolo y Monterrey	Se reporta la pérdida de los peces engordados en jaulas, a partir de los huracanes y su liberación hacia las respectivas presas
San Luis Potosí	Estanques rústicos y circulares. Jaulas flotantes.	Río Tamapaón	Tamaulipas	Pescaderías locales	
Zacatecas	Estanques rústicos	Presa Julián Adame	Coahuila	Repoblación de presas	Producción rústica: sin nidos ni incubación
Sinaloa	Estanques rústicos	Gustavo Díaz Ordaz	Desconocido	Pescaderías locales	-
Sonora	No hay reportes	Presa Álvaro Obregón y Lázaro Cárdenas	Desconocido	Pescaderías locales	-
Puebla	Estanques circulares	No hay reportes	Tamaulipas	Pescaderías locales	La activad ha decrecido. Se desintegró el Comité Sistema Producto Bagre y sólo quedan algunos productores

Tabla 5. Unidades de producción acuícolas de bagre de canal en México. NR: no existen reportes.

Estado	Granjas comerciales	Granjas de autoconsumo	Superficie cultivada (ha)
Baja California	9	0	NR
Coahuila	13	44	50.00
Colima	15	0	2.00
Chihuahua	30	45	40.00
Durango	0	10	2.50
Estado de México	2	13	8.00
Guanajuato	6	1	5.26
Guerrero	24	0	NR
Hidalgo	9	0	0.76
Jalisco	68	0	112.00
Michoacán	14	6	36.00
Morelos	1	0	0.96
Nuevo León	NR	NR	NR
Puebla	12	7	5.00
Querétaro	1	0	0.015
San Luis Potosí	10	2	10.00
Sonora	NR	NR	NR
Tamaulipas	30	0	60.00

Tabla 6. Características principales de las granjas reproductoras de bagre de canal de México.

Característica	Descripción y frecuencia
Sistema de manejo	Intensivo (54%), extensivo (46%)
Superficie cultivada	2-120 ha
Personal empleado	Hombres (86%), mujeres (14%)
Objetivo de cría	Fertilidad (36%), tasa de crecimiento (27%), talla (23%), resistencia a enfermedades (14%)
Origen de progenitores	Tamaulipas (61%), EUA (22%), Coahuila (17%)
Criterio de selección	Talla (63%), edad (22%), apariencia (10%), fertilidad (5%),
Tasa de reemplazo (%)	10 (83%), 20 (17%)
Problemática	Cantidad y calidad de agua (25%), costos (25%), calidad de progenitores (19%), inseguridad (12.5%), capacitación (12.5%), comercialización (6%)
Enfermedades prevalentes	Ectoparásitos (37%), hongos (32%), bacterias (32%)
Período de crianza	Marzo-octubre
Relación macho: hembra	2:1 (30.7%), 3:1 (30.17%), 1:1 (15.3%), 5:1 (15.3%), 1:2 (7.6%)
Edad de reproductores	1-7 años
Densidad de siembra (reproductores por m^3)	4 (46%), 3 (31%), 6 (23%)
Tipo de nido	Cajas de madera (38%), botes de leche (25%), cubetas 20 L (18%), ollas de barro (6%), tubos de PVC (6%), llantas (3%), ninguno (3%)
Registros productivos	Peso de hueva (78%), estanque (12%), fecha (4%), ninguno (4%), color (2%)
Período de incubación	5-10 días
Manejo de residuos	Riego agrícola (76%), ninguno (24%)

bién evidente la presencia de ejemplares importados. Los reproductores son elegidos según su tamaño por la mayoría de los productores y durante cada ciclo se reemplaza del 10 al 20% los peces, siempre con peces de los lotes propios. Con respecto a los problemas identificados, la disponibilidad de agua de calidad y los costos de alimentación suponen los conflictos más importantes en la actividad acuícola. El periodo de reproducción varía entre granjas durante el periodo marzo-octubre. Los peces son sembrados a densidades igualmente variables entre unidades de producción y la relación macho:hembra utilizada por los productores es muy diversa.

Tabla 7. Características principales de las granjas de engorde de bagre de canal de México.

Característica	Descripción y frecuencia
Número de jaulas	20-75
Problemática principal	Precio en el mercado (70%), costo de alimentación (30%)
Personal empleado	Hombres (92%), mujeres (8%)
Origen de los organismos	Tamaulipas (100%)
Criterio de selección	Talla (100%)
Enfermedades prevalentes	Endoparásitos (70%), ectoparásitos (30%)
Registros productivos	Talla (36%), ninguno (36%), temperatura del agua (28%)
Densidad de siembre (ind m^{-3})	50-120
Talla a la siembra (pulgadas)	4-6
Periodo de engorda (meses)	8-12
Peso a la cosecha (gramos)	500-700
Tasa de mortalidad	10-30%
Temporada de mayor mortalidad	Octubre-febrero
Presentación de venta del producto	Vivo (53%), eviscerado (26%), filete (11%), cocinado (10%)

El ejemplo más claro de la variabilidad en el manejo en la acuicultura de bagre de canal es el tipo de nido usado en la reproducción. El uso de nido varía según la región y la experiencia de los productores, siendo los botes lecheros y los cajones de madera la elección más popular. Otros nidos incluyen cubetas de 20 L, ollas de barro, tubos de PVC y llantas. Incluso, se observó que ante la falta de nidos, los peces excavan en los estanques rústicos o utilizan las instalaciones de bombeo para depositar los huevos. Las masas de huevos se pueden considerar el primer producto en la acuicultura de bagre de canal. Los estanques, tipos de nido, calidad de agua y fertilidad de los reproductores son algunos de los factores que afectan la calidad y cantidad de huevos producidos. Dado que se espera obtener un alevín de cada huevo, esta etapa es de gran importancia. Sin embargo, el único control reportado por los productores es el número de masas ovígeras que produce cada estanque, aunque se podría estimar la fertilidad, huevos por kg de peso de hembra, supervivencia, porcentaje de eclosión, temperatura e incubabilidad, entre otros. Otro aspecto que pudiera relacionarse con los factores anteriores es el tiempo que tardan las crías en eclosionar. De acuerdo a las encuestas, este tiempo varía entre 5 y 9 días, sin que se cuente, con los datos necesarios para estimar dicha relación.

Las granjas de engorda comparten problemáticas como costos de alimentación y disponibilidad de agua, entre otras. La engorda de bagre ocurre principalmente en jaulas flotantes en presas o ríos; esto reduce al mínimo los costos de producción y mantenimiento necesario, al tiempo que proporciona un flujo constante de agua, así como temperatura y oxigenación controladas. El número de jaulas por unidad de producción varía entre 20 y 75. Los peces son comprados en los criaderos locales y seleccionados en base al tamaño del individuo. La talla de siembra varía entre 4 y 6 pulgadas, variando en razón del tamaño de malla usada en las jaulas. La densidad de siembra fluctúa entre 50 y 120 ind m^{-3} y se crían por un periodo de 8 a 12 meses, hasta que alcanzan la talla comercial de 500-700 g. La temporada de mayor mortalidad se reporta de octubre a febrero, con tasas del 10-30%, en relación a las bajas temperaturas. El personal empleado por las granjas de engorde es significativamente menor a los criaderos y la mano de obra es principalmente a masculina.

Otra de las tendencias identificadas en el presente estudio es que el bagre se produce a partir de la demanda local. Este hecho es fácilmente observable con la disponibilidad de bagre en los alrededores de las granjas, ríos o embalses; ya sea fresco o cocinado a la usanza local y regional. En este rubro se observó que los productores que ofrecen el producto cocinado obtienen hasta tres veces más ganancias que si lo venden a pie de granja, por lo que es común que existan restaurantes asociados a las granjas o cooperativas pesqueras.

Existe una sola procesadora de bagre de canal en el país: Integradora Piscícola de Tamaulipas S.A de C.V. En ella se recoge el producto de la cooperativa local asociada y se vende en diferentes presentaciones, que incluyen bagre entero, eviscerado, filete, nuggets y fajita, mediante marcas como “Blanco Santander” y “Farm Catch”. Este producto se distribuye en el país mediante cadenas comerciales como HEB. Esta modalidad supone la ventaja de una producción continua, a diferencia de los mercados locales, donde la demanda del producto ocurre específicamente durante la época de Cuaresma.

Existen rubros que no han podido ser caracterizados debido a que los procesos no se encuentran bien estandarizados o simplemente no son documentados. Entre ellos, los costos de producción, la influencia que tiene el manejo sobre los peces o el posible impacto de las poblaciones domésticas sobre las silvestres o viceversa.

DISCUSIÓN

Ocurrencia de peces ictalúridos en México

Pocas especies acuícolas mexicanas son susceptibles de explotación con fines comerciales y el bagre de canal posee un potencial que ha pasado desapercibido hasta la fecha. Sin embargo, la acuicultura es considerada como una de las principales causas de la presencia de especies acuícolas invasoras en México y el bagre de canal ha sido recientemente clasificado (Mendoza *et al.*, 2014), como una especie exótica en cualquier represa del territorio nacional, puesto que su presencia en embalses es mediada por la introducción incidental. Los fenómenos naturales son la vía de escape más común de organismos domésticos hacia represas y ríos. La ocurrencia de una especie exótica está sujeta a la presencia de depredadores naturales, disponibilidad de alimento y su capacidad reproductiva y, debido a que los peces domésticos son a menudo elegidos por sus características superiores (facilidad de adaptación, resistencia a enfermedades, eficiencia en la conversión alimenticia, entre otras), es factible que tengan mayor probabilidad de sobrevir en un hábitat natural (Houde *et al.*, 2010). Por lo tanto, es de gran importancia determinar si el bagre de canal ha podido adaptarse a nuevos hábitats y la influencia que pudiera tener sobre estos ecosistemas.

No existen datos recientes sobre las poblaciones silvestres de bagre nativas del norte del país; si han sufrido por la influencia de la industrialización en la zona fronteriza, si han sido capaces de sobrevivir a los fénomenos naturales, si su población se ha dividido por barreras geográficas o si se han mezclado con bagres domésticos cultivados en Texas, Tamaulipas, Durango o Chihuahua. Las poblaciones silvestres suelen tener mayores niveles de variabilidad genética debido a su dinámica poblacional, lo que las convierte en una fuente potencial de reproductores para iniciar o mejorar las granjas acuícolas mexicanas.

Adicionalmente, conocer las características genéticas y fenotípicas del bagre mexicano permitiría la identificación de productos y subproductos comercializados en el país. Este hecho cobra importancia al analizar la influencia de las especies del género *Pangasius*, que durante la última decada se importa al país a precios que no permiten la competencia del producto nacional. El etiquetado de productos bajo el nombre de "bagre" es una práctica muy común en el mercado mexicano. Inclusive los reportes oficiales sobre pesca y acuicultura incluyen bagre bandera, bagre de canal o bagre genérico en las estadísticas productivas. La implementación de un método de identificación molecular del bagre mexicano, como la secuenciación del gen de la citocromo oxidasa I (Wong *et al.*, 2011), permitiría rastrear su origen, desplazamiento, importación e inocuidad, proveyendo así una herramienta para el mercado y reglamentación del producto en el país. Desde cualquier perspectiva, la caracterización de las poblaciones silvestres de bagre de canal en México es una necesidad que se acompaña de beneficios indudables para la acuicultura nacional.

Uno de los aspectos identificados mediante el presente trabajo es la falta de literatura científica arbitrada. Es importante tomar conciencia sobre la importancia de bagre de canal como especie nativa mexicana y su potencial económico.

Sistema productivo de bagre de canal

El análisis de las encuestras aplicadas a productores de bagre permitió identificar tendencias interesantes. Las técnicas usadas en México tienen gran influencia de la industria estadounidense; sin embargo, es importante notar que el conocimiento se va generando de manera eurística con base al ensayo y error, por lo cual los resultados, en general, no son transmitidos, ni mucho menos documentados o publicados, por lo que es indispensable desarrollar planes de manejo enfocados en las necesidades y ventajas particulares de cada tipo de producción y región.

México posee una amplia variedad de recursos que hacen factible el cultivo de bagre de canal, entre ellos un gran número de ríos, represas y agua subterránea que han sido mencionados como precursores de la acuicultura. A pesar de esto, la obtención de agua de calidad fue identificada por los productores como la problemática principal en la acuicultura de bagre. En la región central del país, los productores usan agua de pozo para la cría de bagre y mencionan que los altos costos de operación influyen sobre sus ganancias. Sin embargo, el agua de pozo es reconocida como la mejor opción para la acuicultura debido a sus bajos niveles de abonos y pesticidas, o la ausencia de otros peces silvestres. Por otro lado, el Centro Acuícola "La Rosa" en Coahuila, es uno de los más productivos del país y se ubica en una zona desértica con claras limitaciones en la disponibilidad de agua en cantidad y calidad. Por otra parte, el Centro Acuícola "La Boquilla" en Chihuahua, se nutre de una represa que le brinda agua

templada durante todo el año, lo que permite un mayor dinamismo en la reproducción.

A pesar de la creciente producción nacional de bagre y del evidente potencial productivo del país, la importación de peces de USA sigue siendo una realidad. Desde sus inicios, la acuicultura del bagre se ha basado en peces importados. El mercado estadounidense maneja varias líneas, incluso cruzas, que han demostrado ser sobresalientes en algunas características productivas. Sin embargo, como se ha comprobado, la acuicultura de bagre es un medio importante para la diseminación de los peces en nuevos hábitats, por lo tanto la introducción no controlada de peces americanos al país debe ser tomada con mucha seriedad para evaluar correctamente los riesgos que la misma supone a las poblaciones silvestres de bagres mexicanos.

Por otro lado, a pesar que los productores manifiestan interés en tener peces más fértiles, la selección de los reproductores se hace en base a la talla de los mismos. La fertilidad y la talla son dos características independientes con base genética. Seleccionar arbitrariamente a los peces más grandes de un lote de ningún modo permite suponer que dichos peces serán más fértiles. Por el contrario, si se toma en cuenta que el 10% de los reproductores son reemplazados cada año con juveniles emparentados, es de esperarse que la depresión consaguínea conduzca a una acuicultura cada vez menos productiva (Parra-Bracamonte *et al*., 2011).

Probablemente uno de los aspectos más importantes en la producción de bagre de canal es el uso de nidos. En su hábitat natural, los bagres eligen cuevas, troncos huecos, raíces y demás cavidades para depositar huevos (Tucker & Hargreaves, 2004). La gran variedad de nidos usados en México es el indicador más claro de la falta de homologación en el sistema productivo nacional. Los bagres prefieren ciertos nidos cuando tienen la oportunidad de elegir (Busch, 1983), pero el éxito de los nidos depende en mayor medida de que se ajusten al tamaño de la pareja de reproductores. La selección del nido por los productores mexicanos varía en función de su disponibilidad y precio, manejabilidad, disponibilidad, facilidad de limpieza, etc. Es probable que la naturaleza de los nidos influya sobre la producción de huevos, sin embargo no existen datos para validar esta hipótesis. También en relación con el "montaje" de la reproducción, la relación hembra:macho es un aspecto ampliamente estudiado desde hace varias décadas. No obstante, los productores mexicanos caen incluso en el exceso de usar dos machos por cada hembra, desencadenando de este modo disputas territoriales que resultan en lo que pudiera interpretarse como una tasa de fertilidad nula.

Una de las observaciones más relevantes a partir de las encuestas es que los productores no llevan registro de los diversos parámetros que observan en sus granjas. Particulamente, la medición de parámetros productivos (tolerancia a diversos niveles de oxígeno y salinindad, eficiencia de conversión alimenticia, resistencia, crecimiento, facilidad de manejo, palatabilidad, fertilidad, incubabilidad, supervivencia, entre otros), puede permitir relacionar el desempeño de los organismos bajo distintos esquemas de producción. Específicamente, se podría evaluar si el tipo de alimento influye sobre el crecimiento de los peces, la densidad de siembra en la supervivencia y el crecimiento diferencial de los peces, la proporción de reproductores o nidos sobre los huevos y parametros relacionados con la rentabilidad del sistema. Es evidente además que la obtención de datos se debe homogenizar entre todos los productores; por ejemplo, en la acuicultura en jaulas los peces son medidos al inicio del ciclo porque se requieren peces de al menos 4 pulgadas para producirse en jaulas flotantes; sin embargo, al término del proceso los peces se pesan para venderlos a los 500 g, por lo que resulta difícil un comparativo de la producción puesto que se emplean distintas unidades de medida. Estos registros se pueden relacionar también con la necesidad de capacitación mencionada por los productores como necesidad a corto plazo. La generación de material didáctico o asesores profesionales se relaciona con la disponibilidad de la información, capacidad para generarla y el compromiso de diversos sectores de la sociedad para con la industria.

Mediante el análisis de la información recopilada, se pueden identificar fortalezas y debilidades en el sistema productivo bagre de canal en México. Tener poblaciones silvestres de una especie de gran potencial acuícola, recursos hídricos y regiones climáticas adecuadas, favorecen la producción de la especie en el país. Los productores mexicanos cuentan con décadas de experiencia empírica en la producción de bagre de canal. La colaboración de instituciones gubernamentales y privadas, así como la toma de decisiones con base al método científico coadyuvaría a la formación de un sistema productivo altamente eficaz. En México ya existe un mercado de distribución del producto. El 100% del bagre producido en el país se consume y es factible considerar la exportación del producto. Como ejemplo, se puede considerar a la industria de bagre de canal en Estados Unidos donde la publicidad jugó un papel clave en su éxito.

Entre las principales debilidades identificadas se puede nombrar la falta de planeación para tener peces de talla comercial disponibles durante todo el año. La estratificación de los cultivos y la organización de los

productores en cooperativas son muy importantes para proveer crías para engorde durante todo el año y del mismo modo cosechar animales de talla comercial de manera regular.

Por otro lado, los productores mexicanos señalan el alimento como el principal gasto en la producción de bagre; los residuos de las procesadoras -tales como piel y huesos- pudieran ser utilizados para el diseño de formulaciones con los requerimientos nutricionales específicos del bagre de canal. Tamaulipas es el principal productor de soya a nivel nacional y ésta podría ser una buena alternativa para abaratar el costo del alimento (Islas-Rubio & Higuera-Ciapara, 2002).

La optimización del sistema productivo debe verse reflejada en el precio final de los productos y subproductos. El descenso del costo ayudaría al mercadeo del producto, a la vez que lo haría más competitivo frente a los productos asiáticos. En general, la homogenización de los procedimientos y la optimización de los mismos en base a las necesidades de los productores, permitirá sentar las bases sobre las cuales puede comenzar a planearse un programa de mejoramiento genético que resulte en la obtención de una línea mexicana de bagre de canal que permita explotar al máximo el potencial productivo del país, para consolidar una cadena productiva exitosa y contribuir así de manera significativa a la economía nacional.

AGRADECIMIENTOS

Investigación apoyada por el Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACyT-Gobierno del Estado de Tamaulipas. Proyecto 150598, la Secretaría de Investigación y Postrado del Instituto Politécnico Nacional. (Proyecto SIP 20143982). El presente trabajo se deriva de la Tesis doctoral de la primera autora, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Los autores agradecen a: Biol. Nely Reyes (Comité Sistema Producto Bagre Tamaulipas), Biol. Hugo Arias (Comité de Sanidad Acuícola Jalisco), Dr. José Herrera Camacho y M.C. Jessica Herrera Hojeda (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Ing. Armando Pacheco (CONAPESCA, Chihuahua), M.C. Lorena Vázquez (CIIDIR-IPN, Sinaloa). Ing. Manuel Ochoa, Ing. Daniel Montaño e Ing. Julio Ortiz. C. Sergio Balboa, Ignacio Lara e Ing. Roque Cantú por su aportación en la colecta de bagres silvestres. A todos los productores que tan amablemente nos abrieron sus puertas y proporcionaron información sobre sus unidades de producción.

REFERENCIAS

Busch, R.L. 1983. Evaluation of three spawning containers for channel catfish. Prog. Fish. Cult., 45: 97-99.

Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México (CONAPESCA). 2014. Organismos en Centros Acuícolas Federales (Programa e5cinco). [http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/cona_venta_de_organismos_ca] Revisado: 10 julio 2014.

Cuvier, G. & A. Valenciennes. 1828. Histoire naturalle des Poissons. Paris, pp. 421-455.

De Buen, F. 1940. Un nuevo género de la familia Goodeidae perteneciente a la fauna ictiológica mexicana. An. Esc. Nac. Cienc. Biol., 40(2-3): 133-140.

Espinosa-Pérez, H.T., P. Gaspar-Dillanes & A. Fuentes-Mata. 1993. Los peces dulceacuícolas mexicanos. Serie listados faunísticos de Mexico. III. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 62 pp.

Follet, W.I. 1960. The freshwater fishes: their origins and affinities. Symposium on biogeography of Baja California and adjacent seas. Syst. Zool., 9: 212-232.

Girard, C.F. 1858. Notes upon various new genera and new species of fishes, in the Museum of the Smithsonian Institution, and collected in connection with the United States and Mexican boundary survey: major William Emory, Comissioner. P. Acad. Nat. Sci. Phila., 10: 167-171.

González, A.I., Y. Barrios, G. Born-Schmidt & P. Koleff. 2014. El sistema de información sobre especies invasoras. In: R.E. Mendoza & P. Koleff (Coord.). Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F., pp. 95-112.

Hendrickson, D.A. 1984. Distribution records of native and exotic fishes in the Pacific drainages of northern México. J. Arizona-Nevada Acad. Sci., 18: 33-38.

Houde, A.L., D.J. Fraser & J.A. Hutchings. 2010. Fitness-related consequences of competitive interactions between farmed and wild Atlantic salmon at different proportional representations of wild–farmed hybrids. ICES J. Mar. Sci., 67: 657-667.

Islas-Rubio, A.R. & I. Higuera-Ciapara. 2002. Soybeans: post-harvest operations. FAO, United Nations, 93 pp.

Jackson, D.C. 2004. Natural history and fisheries. In: C.S. Tucker & J.A. Hargreaves (eds.). Biology and culture of channel catfish. Elsevier, Amsterdam, pp. 15-35.

Jordan, D.S. & B.W. Evermann. 1896-1900. The fishes of north and middle America. Bull. U.S. Nat. Mus., 47(1-4): 1-3313.

Jordan, D.S. & J.O. Snyder. 1900. Notes on a collection of fishes from the rivers of Mexico, with descriptions or

twenty new species. Bull. U.S. Fish. Comm., 19: 115-147.

Levêque, C., T. Oberdorff, D. Paugy, M.L.J. Stiassny & P.A. Tedesco. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. In freshwater animal diversity assessment). Springer, Netherlands, pp. 545-567.

Lundberg, J.G. 1992. The phylogeny of ictalurid catfishes: a synthesis of recent work. In: R.L. Mayde (ed.). Systematics, historical ecology, and North American freshwater fishes. SUPS. Stanford, California, pp. 392-420.

Mendoza, R., C. Ramírez-Martínez, C. Aguilera & M.A. Meave. 2014. Principales vías de introducción de las especies exóticas. In: R.E. Mendoza & P. Koleff. (Coord.). 2014. Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. D.F., pp. 44-67.

Miller, R.M. 2005. Freshwater fishes of México. University of Chicago Press, Chicago, 490 pp.

Miller, R.R. & M.L. Smith. 1986. Origin and geography of the fishes of Central Mexico. In: C.H. Hocutt & E.O. Wiley (eds.). The zoogeography of North American freshwater fishes. John Wiley & Sons, New York, pp. 491-517.

Miller, R.R., W.L. Minckley & S.M. Norris. 2005. Freshwater fishes of México. University of Chicago Press, Chicago, 490 pp.

Minckley, W.L., D.A. Hendrickson & C.E. Bond 1986. Geography of western north american freshwater fishes: description and relationships to Intracontinental Tectonism. In: C.H Hocutt & E.O. Wiley (eds.). The Zoogeography of North American freshwater fishes. John Wiley and Sons, 15: 519-613.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONU). 2014. Departamento de Pesca y Acuicultura. Programa de información de especies acuática: *Ictalurus punctatus*. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ictalurus_punctatus/es.] Revisado: Junio de 2014.

Received: 24 September 2014; Accepted: 9 April 2015

Page, L.N. & B.M. Burr. 1991. A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico. The Peterson Field Guides Series, Houghton Mifflin, Boston, 432 pp.

Parra-Bracamonte, G.M., A.M. Sifuentes-Rincón, X.F. De la Rosa-Reyna, W. Arellano-Vera & B. Sosa-Reyes. 2010. Desarrollo tecnológico para el mejoramiento de especies acuícolas de interés comercial. Recurso bagre de canal-Informe final, Instituto Politécnico Nacional, Tamaulipas, 144 pp.

Parra-Bracamonte, G.M., A.M. Sifuentes-Rincón, X.F. De la Rosa-Reyna, W. Arellano-Vera & B. Sosa-Reyes. 2011. Inbreeding evidence in a traditional channel catfish (*Ictalurus punctatus*) hatchery in Mexico. Electron. J. Biotechnol., 14: 1-11.

Pérez-Ponce, G. & A. Choudhury. 2002. Adult endohelminth parasites of Ictalurid fishes (Osteichthyes: Ictaluridae) in Mexico: empirical evidence for biogeographical patterns. Comp. Parasitol., 69: 10-19.

Ruiz-Campos, G. 1995. First occurrence of the yellow bullhead, *Ameiurus natalis*, in the lower Colorado River, Baja California. Calif. Fish Game, pp. 76-84.

Rutter, C.M. 1986. Notes on fresh water fishes of the Pacific slope of North America. The fishes of Rio Yaqui, Sonora, with the description of a new genus of Siluridae. Proc. Calif. Acad. Sci., 255-262.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2013. Diario Oficial de la Federación. Carta Acuícola, pp. 11 -15.

Tucker, C.S. & J.A. Hargreaves. 2004. Biology and culture of channel catfish. Elsevier, Amsterdam, pp. 15-35.

Wong, L.L., E. Peatman, J. Lu, H. Kucuktas, S. He, C. Chou, U. Na-nakorn & Z. Liu. 2011. DNA Barcoding of Catfish: species authentication and pjylogenetic assessment. PLoS ONE 6(3):e17812. doi:10.1371/journal.pone.0017812.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 435-445, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-5

Research Article

Growth and metabolic responses of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in polyculture fed with potential probiotic microorganisms on different schedules

Juan P. Apún-Molina[1,2], Apolinar Santamaría-Miranda[2], Antonio Luna-González[2]
José C. Ibarra-Gámez[3], Vladimir Medina-Alcantar[4] & Ilie Racotta[5*]
[1]Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Sonora
Ciudad Obregón, Sonora 85000, México
[2]Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-IPN
Unidad Sinaloa, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa 81101, México
[3]Laboratorio de Sanidad Acuícola, Instituto Tecnológico de Sonora, Ciudad Obregón, Sonora 85000, México
[4]Universidad de Occidente, Campus Guasave, Sinaloa 81200, México
[5]Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur 23096, México
Corresponding author: Ilie S. Racotta (iracotta@cibnor.mx)

ABSTRACT. Probiotics and co-culture of shrimp and tilapia are two strategies to improve yield and eco-efficiency of both species. However, only few studies have analyzed the combination of these two strategies. This study analyzes the effect of a mixture of potential probiotics supplied in the diet at different frequencies in a system of shrimp (10 m^{-2}) and tilapia (5 m^{-2}) in a trial lasting 84 days. The probiotics mixture was composed of four lactic acid bacteria and one yeast strain that were supplied either daily, every 5 days, or every 10 days in the diet and compared with a control without any supply of probiotics. At the end of the experiment, blood chemistry and hematology of shrimp and tilapia were analyzed as an index of physiological condition. Water quality did not differ between treatments. The final weight, feed conversion ratio, and yield of shrimp were significantly higher with daily supply of probiotics compared to shrimp that did not receive probiotics supply, with intermediate values for treatments with probiotics supply every 5 or 10 days. However, level of supplementation every 5 days could be considered as optimal because no significant differences with daily supply were observed for any variable, whereas the supply each 10 days resulted in a significantly lower yield. Significantly higher final weight, feed conversion ratio, and yield of tilapia occurred with daily supplements. Blood cholesterol in tilapia significantly decreased with increasing frequency of probiotics supplementation. These results indicate that probiotics supplements for shrimp and tilapia cultivated simultaneously improved yields and physiological condition.

Keywords: *Lipenaeus vannamei*, *Oreochromis niloticus*, shrimp, tilapia, probiotics, blood chemistry, growth.

Crecimiento y respuesta metabólica del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* en policultivo alimentado con microorganismos probióticos potenciales en diferentes frecuencias

Los probióticos y el co-cultivo de camarón y tilapia son estrategias para mejorar el rendimiento y la eco-eficiencia de ambas especies. Sin embargo, pocos estudios han analizado la combinación de estas dos estrategias. Este artículo analiza el efecto de una mezcla de probióticos potenciales suministrados en la dieta, en diferentes frecuencias, en un cultivo de camarones (10 m^{-2}) y tilapia (5 m^{-2}) durante 84 días. La mezcla de probióticos, compuesta de cuatro bacterias ácido lácticas y una cepa de levadura, fue suministrada cada 24 h, cada 5 días y cada 10 días, en la dieta y fueron comparados con un grupo control sin probióticos. Al final del experimento, se analizaron los resultados de la química sanguínea y la hematología del camarón y la tilapia. No se observaron diferencias significativas en la calidad del agua entre los cuatro tratamientos. Los valores de peso final, factor de conversión alimenticia y rendimiento de camarón fueron significativamente mayores con el suministro diario de los probióticos en comparación a los camarones del grupo control, con valores intermedios para los tratamientos con probióticos suministrados cada 5 o 10 días. Sin embargo, el suplemento ofrecido cada 5 días podría

Corresponding editor: Ronaldo Cavalli

considerarse como óptimo, dado que no se observaron resultados significativamente diferentes al suministro cada 24 h, mientras que el suministro cada 10 días fue significativamente inferior. El peso final, conversión alimenticia y rendimiento de tilapia fueron significativamente mayores con el suplemento cada 24 h. El colesterol en la tilapia se redujo significativamente al aumentar la frecuencia del suplemento de probióticos. Estos resultados indican que los probióticos mejoran los rendimientos y la condición fisiológica de camarones y tilapias en co-cultivo.

Palabras clave: *Lipenaeus vannamei*, *Oreochromis niloticus*, camarón, tilapia, probióticos, química sanguínea, crecimiento.

INTRODUCTION

Shrimp farming is the most developed segment of the aquaculture industry in Mexico, with a total production of 109,815 ton in 2011 (CONAPESCA, 2012). Tilapia consumption in Mexico greatly increased in recent years, greatly exceeding national fisheries and aquaculture production, and therefore requires large imports from Asia. A national priority for tilapia aquaculture was recognized, estimating that production could increase 10-fold in the next 10 years, reaching 160,000 ton by 2020 (Panorama Acuícola Magazine, 2010). Shrimp polyculture in Mexico is not a common practice among farmers. It represents an important alternative to solving and/or minimizing some of the problems (environmental pollution, diseases, and decreasing prices), that shrimp aquaculture has encountered in the past two decades. The polyculture of marine shrimp and tilapia is a common practice in some countries, such as The Philippines, where tilapia is used to control particular bacterial diseases (Cruz *et al*., 2008). Although the most common practice is to grow tilapia in reservoirs, where the water is pumped to shrimp ponds, co-existence in the same pond was also tested, providing better results because a better plankton profile and reduced accumulation of waste was achieved (Cruz *et al*., 2008). Such integrated systems provide control of phytoplankton, less accumulation of organic matter, improves P and N conversion rate and decreases viruses load (Rodríguez-Grimón, 2003).

Probiotics in polyculture systems may serve as an alternative for preventing disease and producing higher growth rates. However, less is known about the effects of probiotics on integrated culture systems involving two or more productive species (Jatobá *et al*., 2011). On a single-species basis, improved yields from probiotics in fish or shrimp cultivation have been reported, based on positive effects included promotion of growth, stimulation of immune system, and reduced incidence of diseases (for reviews, see Balcázar *et al*., 2006; Welker & Lim, 2011). The particular microbial strains that we used in the present work, considered as potentially probiotic (PPB), increased resistance to environmental stress events in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Apún-Molina *et al*., 2009), and increased survival to white spot syndrome virus (WSSV) exposure in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Peraza-Gómez *et al*., 2009).

Recent studies indicate that, besides performance during culture, biochemical variables in hemolymph and tissues of shrimp are associated with overall physiological condition (Rosas *et al*., 2004). Protein, hemocyanin, and glucose levels in the hemolymph are associated with the nutritional status of shrimp. Acylglycerides and cholesterol can be used as indicators of food quality (Pascual *et al*., 2003) Protein levels are also related to the immune response (Perazzollo *et al*., 2002; Mercier *et al*., 2006), whereas glucose and lactate levels represents the most typical stress response (Racotta & Palacios, 1998; Racotta *et al*., 2002; Mercier *et al*., 2009). Even if some of the studies provided evidence and suggested that biochemical composition of hemolymph or blood can be used as indicators of physiological performance, there are no practical approaches ever been tested.

The purpose of this study was to determine the influence of probiotics supplied at different schedules on growth, survival, and associated hemolymph and blood biochemical composition of shrimp and tilapia, when fed probiotics at different intervals during joint culture.

MATERIALS AND METHODS

Selection of strains of microorganisms and supply trough feed

The probiotics mixture used in this work included four lactic acid bacteria strains (*Pediococcus parvulus* Lta2, *Pediococcus parvulus* Lta6, *Pediococcus parvulus* Lta8, *Pediococcus parvulus* Lta10) and the yeast (*Candida parapsilosis* Lta6) as potential probiotics (PPB). All of them were originally isolated from the intestine of apparently healthy Nile tilapia *O. niloticus* cultivated at Centro Interdisciplinario de Investigaciones para el Desarrollo Integral Regional-Instituto Politécnico Nacional (Apùn-Molina *et al*., 2009) and identified by Luna-González *et al.* (2013).

The mixture of PPB was sprayed on commercial tilapia and shrimp pellets (32% protein), both from

Purina® (Ciudad Obregón, Mexico), at a concentration of 500,000 CFU g^{-1} (100,000 CFU/strain). A feed additive, Dry Oil® (DO, Innovaciones Acuícolas S.A. de C.V., Culiacán, Mexico) was used as an adhesive and a feed attractant, following the manufacturer's instructions. Feed was dried at room temperature (26 ± 1°C) for 5 h and stored at 4°C for 10 days, with an initial concentration of bacteria in the feed of 500,000 CFU g^{-1} and a decrease to 400,000 by day 10 (Apún-Molina *et al*., 2009).

Experimental design

Tilapia *O. niloticus* specimens (initial weight 6.2 ± 0.08 g) were obtained from the Aquaculture Laboratory of CIIDIR-IPN (Guasave, Sinaloa, Mexico), and shrimp *L. vannamei* (initial weight 2.5 ± 0.06 g) were obtained from a commercial hatchery. Both species were acclimated to salinity of 5 and stocked at density of 10 shrimp m^{-2} and 5 fish m^{-2} in 1000 L tanks, supplied with aerated water. Based on the supply frequency of PPB, the bioassay was designed with four treatments in triplicate: D/1 (daily supply), D/5 (supplied every 5 days), D/10 (supplied every 10 days), and DX (control, without bacteria supplementation). Dry oil without PPB sprayed on DX treatment, as well as on D5 and D10 treatments on days not supplemented with PPB.

The experiment conducted for 84 days, with 30% water exchange weekly for the first 30 days and 50% for the rest of the experiment. Shrimp and fish fed at the rate of 3% of the body weight. Shrimp and tilapia were grown under natural photoperiod (average 12 h light: 12 h dark cycle), ambient temperature, and salinity of 5. During the experiment, pH, temperature, salinity, and dissolved oxygen were measured daily. Ammonia, nitrites, nitrates, and phosphates were analyzed twice monthly using the method described by Strickland & Parsons (1972).

Relative and absolute growth and feed conversion ratio were calculated with the following equations:

The absolute daily growth rate (AGR) estimated for each treatment as a function of $W_f - W_0$ over time (T) where: W_f and W_0 is the final and initial weight, respectively, and T is the number of days in the experimental period.

Specific growth rates (SGR) = $[(\ln W_f - \ln W_0) / T)] \times 100$, where T is the duration of the experiment, W_0 is the weight of the animals at the beginning of the experiment, and W_f is the final weight of the animals at the end of the trial. Feed conversion ratio (FCR) = $F / (W_f - W_0)$, where F is the weight of feed supplied to the fish and shrimp during the trial (Ziaei-Nejad, 2006).

Sampling and analyses of metabolic variables in shrimp

Metabolic response of shrimp (n = 15 per treatment, 5 per replicate) was determined in hemolymph. The hemolymph (200 µL) was sampled individually, from the ventral sinus at the base of the first abdominal segment with a 3 mL syringe rinsed with cooled 5% potassium oxalate in isotonic saline anticoagulant solution (Mercier *et al.,* 2006). Hemolymph, centrifuged at 800 g for 10 min at 4°C, and plasma separated and stored at -75°C for further analyses. All shrimp used in the analysis were in the intermolt or early premolt stages. Lactate, glucose, and triglyceride concentrations were analyzed from plasma, using commercial kits: lactate (PAP, Randox Laboratories, Antrim, UK), glucose (GOD-PAP, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), triglycerides (GPO-PAP, Randox Laboratories). Determinations were adapted to microplates using 20 µL samples and 200 µL enzyme chromogen reagent (Racotta & Palacios, 1998). Optical density recorded with a microplate reader. Concentrations calculated from a standard solution of substrates. Total proteins were determined according to Bradford (1976), using a protein dye reagent concentrate and hemocyanin by direct absorbance at 335 nm (Hagerman, 1983).

Sampling and analyses of metabolic and hematological variables of tilapia

Blood samples collected from all fish that survived were placed in tubes containing either lithium heparin for biochemical analysis or EDTA for hematologic analysis, and used for determining erythrocyte count; hematocrit and hemoglobin content (Dacie & Lewis, 1984). For biochemical analyses, plasma was obtained by centrifugation of blood at 800 g for 15 min, separated, and stored at -75°C for later analyses of triacylglycerides, glucose, total protein, and cholesterol, as described for shrimp samples.

Statistical analyses

A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to examine differences between treatments. A Newman-Keuls HSD multiple comparison tests were used to determine significance among individual groups identifying these differences ($P < 0.05$).

RESULTS

Water quality

Water quality variables did not differ among treatments. Temperature decreased from 28.8°C in

August to 23.2°C in November. Salinity was maintained at 5, while pH ranged between 8.17 and 8.38, and dissolved oxygen from 7.21 to 8.43 mg L^{-1}. Levels of ammonia (0.0225 mg L^{-1}), nitrites (0.145 mg L^{-1}), nitrates (0.124 mg L^{-1}), and phosphates (0.156 mg L^{-1}) were not affected by the supply of potencial probiotics (PPB) (Table 1).

Shrimp performance

The final weight and SGR of shrimp fed daily with PPB were significantly higher ($P < 0.05$) than in shrimp without PPB. However, we found similar results in shrimp fed with PPB every 5 and 10 days. Results showed that AGR of shrimp fed daily with PPB was significantly higher ($P < 0.05$) than shrimp without PPB and shrimp fed PPB every 10 days. FCR was significantly lower ($P < 0.05$) in shrimp fed daily with PPB, compared with shrimp without PPB and fed every 10 days. Survival was not significantly affected by the supply of PPB. Treatments D and D/5 had significantly higher ($P < 0.05$) final yields (kg ha^{-1}), compared to the DX and D/10 treatments (Table 2).

Plasma of shrimp fed with PPB every 5 days showed the highest concentration of glucose (Fig. 1a). No significant differences were observed between treatments for the concentration of triglycerides, total protein, and hemocyanin (Fig. 1).

Performance of tilapia

The final average weight, FCR, SGR, AGR, and yield were significantly higher ($P < 0.05$) in shrimp fed daily with PPB compared with shrimp without PPB and shrimp fed PPB every 5 and 10 days (Table 3). The supply of PPB did not significantly affected survival

No significant differences of hematological variables of tilapia were observed in relation to the dietary supply of PPB (Fig. 2). The highest concentration of cholesterol in tilapia blood occurred in tilapia that did not receive any PPB or were treated every 10 days as compared with tilapia without PPB ($P < 0.05$), with intermediate values for tilapia shrimp fed PPB every 5 days (Fig. 3a). The protein, glucose, and triglycerides concentration, in relation to the frequency of PPB dietary supply, were not significantly different (Fig. 3).

DISCUSSION

Performance of co-cultured shrimp and tilapia

Survival and growth rates were 87% and 0.185 g day^{-1}, respectively. Muangkeow *et al*. (2007) obtained similar results with survival ranging from 84.7-90.8%; whereas growth rate was between 0.21 and 0.24 g day^{-1}. After 8 weeks attaining a final weight of 13.4 to 16 g, when shrimp and tilapia were co-cultured in recirculation systems with shrimp and tilapia stocked in separate tanks, at different ratios of shrimp:tilapia (from 13:1 to 100:1, with a fixed initial density of shrimp of 40 m^{-2}). Under similar conditions as in the present study, in terms of shrimp and tilapia density in the same tanks (10 shrimp m^{-2} and 2 tilapia m^{-2} for 12 weeks), growth and survival rates were 0.1 g day^{-1} and 79.8%, respectively (Jatobá *et al*., 2011). In another study, also using a recirculation system, survival was 100% and daily growth rates ranged from 0.153 to 0.185 g day^{-1} at densities of shrimp: tilapia m^{-2} of 20:0 to 20:8, respectively (Hernández-Barraza *et al*., 2012). Another study obtained a lower yield, with 3-12 shrimp m^{-2} co-cultured with tilapia (2 tilapias m^{-2}). In this case, survival was ~40% and growth rate was from 0.07 to 0.13 g day^{-1}, with a final weight of 8.9-16.1 g after 124 days (Bessa-Junior *et al*., 2012).

In our study, survival of tilapia (86.7%) was similar to the 84.7-90.8% reported by Muangkeow *et al*. (2007), 70.6-83.1% depending on tilapia density (Thien *et al*., 2004), 97.7% (Jatobá *et al*., 2011), or 72-85%, depending on shrimp density (Bessa-Junior *et al*., 2012). The growth rates in this study were 0.8 g day^{-1} without PPB, which is lower than 1.3-1.5 g day^{-1} reported by Bessa-Junior *et al*. (2012), 1.9 g day^{-1} (Jatobá *et al*., 2011), 2.5-3.3 g day^{-1} (Thien *et al*., 2004), or 0.65-3.09 g day^{-1} (Muangkeow *et al*., 2007). It is unlikely that a higher tilapia–shrimp ratio could explain this low growth rate because higher ratios (1:1.5) gave better results (Bessa-Junior *et al*., 2012). In this study, the tilapia density was among the highest (5 tilapias m^{-2}) considering previous studies, for which the highest density was 4 tilapias m^{-2}, and corresponded to the poorest growth rate of 0.65 g day^{-1} (Muangkeow *et al*., 2007). Although Thien *et al*. (2004) reported that the same tilapia density of 4 m^2 grown with the giant tiger prawn *Penaeus monodon* yielded a growth rate of 2.5 g day^{-1}. A decrease in water temperature towards the end of the experiment could also explain the poor growth.

Although the most common practice is to rear tilapia in reservoirs from which water is pumped to shrimp ponds, co-existence in the same pond was also tested with even better results based on the assumption that a better plankton profile and that a reduction in waste accumulation are obtained (Cruz *et al.*, 2008). Moreover, competition is minimal as each species uses particular niches: tilapia can filter feed on phytoplankton and zooplankton in the upper water column, while shrimp spend most of the time in the pond bottom grazing on bacterial films on the bottom substrate and on settling detritus. Therefore, such integrated system will allow the control of phytoplankton growth, decrease the accumulation of organic matter, and reduce the prevalence of viruses (Rodríguez-Grimón, 2003).

Table 1. Effect of dietary supplementation of potential probiotics at different rates on levels nitrogenous and phosphorous compounds in water form a co-culture system in shrimp (10 m^{-2}) and tilapia (5 m^{-2}). Data reported as mean ± SEM of three replicates pooled from weekly determinations.

Concentration (mg L^{-1})	Treatment			
	Daily	Every 5 days	Every 10 days	Control
Ammonia	0.012 ± 0.006	0.022 ± 0.007	0.023 ± 0.003	0.033 ± 0.002
Nitrates	0.145 ± 0.057	0.155 ± 0.023	0.147 ± 0.032	0.133 ± 0.048
Nitrites	0.118 ± 0.032	0.138 ± 0.087	0.125 ± 0.042	0.115 ± 0.073
Phosphates	0.188 ± 0.037	0.175 ± 0.073	0.138 ± 0.045	0.123 ± 0.026

Table 2. Effect of dietary supplementation of potential probiotics at different rates on overall performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* (10 m^{-2}) co-cultured with tilapia (5 m^{-2}). SGR: specific growth rate; AGR: absolute growth rate; FCR: feed conversion rate. Data reported as mean ± SEM of three replicates. Means not sharing the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$). The yield values were extrapolated from kg m^{-2}.

Performance	Treatments groups			
	Daily	Every 5 days	Every 10 days	Control
Initial weight (g)	2.44 ± 0.10	2.55 ± 0.09	2.57 ± 0.11	2.69 ± 0.13
Final weight (g)	20.25 ± 0.30[a]	18.75 ± 0.49[ab]	18.55 ± 0.47[ab]	17.41 ± 0.506[b]
SGR (% day^{-1})	2.63 ± 0.061[a]	2.37 ± 0.043[ab]	2.35 ± 0.094[ab]	2.27 ± 0.084[b]
AGR (g day^{-1})	0.215 ± 0.004[a]	0.193 ± 0.004[ab]	0.189 ± 0.006[b]	0.185 ± 0.011[b]
FCR	1.19 ± 0.017[a]	1.28 ± 0.032[ab]	1.50 ± 0.053[c]	1.42 ± 0.057[bc]
Survival (%)	96.0 ± 5.8	95.6 ± 3.3	92.3 ± 6.7	92.0 ± 5.8
Yield (kg ha^{-1})	2025.3 ± 30.47[a]	1875.7 ± 48.44[a]	1676.7 ± 55-81[b]	1667.6 ± 65.94[b]

Effects of PPB on shrimp and tilapia performance

For FCR and final yield, there is a beneficial effect of PPB on growth of shrimp and tilapia. Although, the treatment with daily supply presented the best values of performance, we could consider that optimum rate of supplementation for shrimp was every 5 days, because there was no significant difference for any variable with supplementation on a daily basis. Supplementation every 10 days resulted in significantly lower yields. In contrast, for tilapia the daily supplementation was the optimum rate as final yield was significantly higher by 33% than the rate of 5 days. A stronger link between frequency of PPB supplementation and higher benefits for tilapia than for shrimp is likely tied to the origin of these PPB strains, which derive from tilapia digestive tract (Apún *et al*., 2009). The benefits of administering PPB in the diet on culture performance has been widely documented for shrimp (Ziaei-Nejad *et al*., 2006; Wang, 2007; Li *et al*., 2008; Far *et al*., 2009) and tilapia (El-Haroun *et al*., 2006; Wang *et al*., 2008; Welker & Lim, 2011). Few studies have examined the benefits of probiotics when the two species are mutually cultured. Jatobá *et al.* (2011) did not find any improvement in shrimp yields, but did find an increase in final weight, feed efficiency, and final yield in tilapia, when fed with *Lactobacillus plantarum* at a rate of four times daily, which was more frequent than our D group. For the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* co-cultured with tilapia, the addition of *Bacillus subtilis* did not result in any improvement for either species in terms of growth rate and feed conversion efficiency (Günther & Jiménez-Montealegre, 2004).

The mixture of PPB used in our study was previously characterized (Apún-Molina, 2007) and showed important benefits for tilapia growth (Apún-Molina *et al*., 2009) and reduction in mortality of shrimp exposed to WSSV (Peraza-Gómez *et al*., 2009, 2011) or *Vibrio sinaloensis* (Flores-Miranda *et al*. 2011). Our study highlights the beneficial effect of this particular PPB mixture on growth of jointly cultured tilapia and shrimp. Flores-Miranda *et al*. (2011) observed the importance of frequency of administration for which protection against *V. sinaloensis* and associated hemocyte count was effective with daily or every 3 days -supplementation, but not every 6 days.

Biochemical parameters in hemolymph of shrimp and blood of tilapia

It is recognized that the beneficial role of probiotics has several physiological bases at different levels. This includes digestive physiology, immune function, and stress response in shrimp (Rengpipat *et al*., 2000; Wang, 2007; Liu *et al*., 2010; Zokaeifar *et al*., 2012)

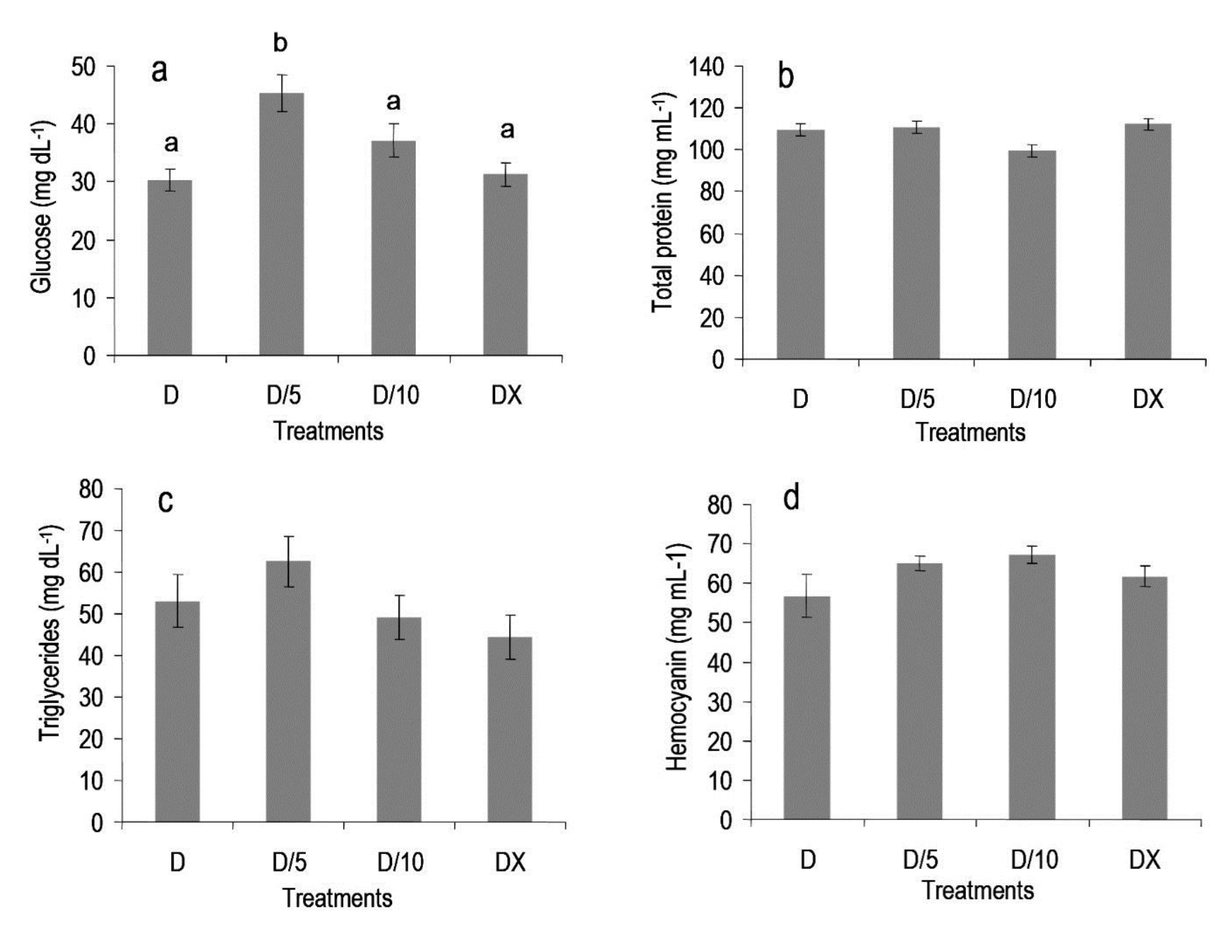
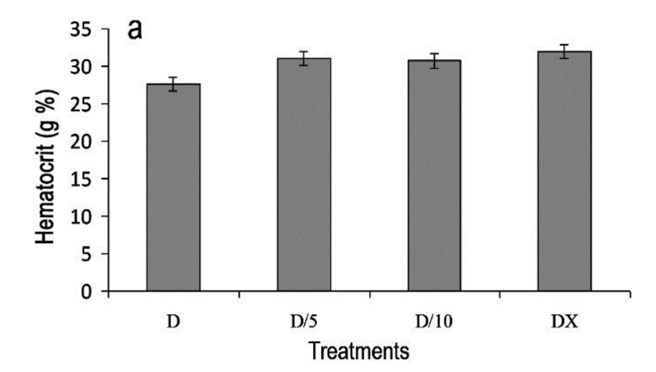


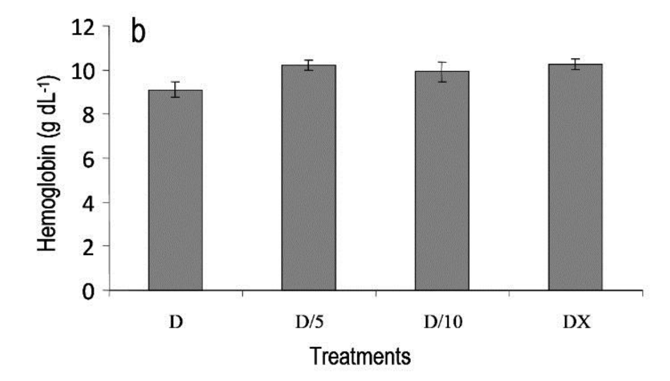
Figure 1. Biochemical variables in hemolymph in shrimps co-cultured with tilapia and fed with dietary supplementation of potential probiotics at different rates. a) Glucose, b) total protein, c) triglycerides, d) hemocyanin. D: Daily supply, D/5: every 5 days supply, D/10: every 10 days supply and DX: Control without any supply. Data reported as means ± SEM of 15 organisms. Means not sharing the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of dietary supplementation of potential probiotics at different rates on overall performance of tilapia *Oreochromis niloticus* co-cultured whit shrimp. SGR: specific growth rate, AGR: absolute growth rate, FCR: feed conversion rate. Data reported as means ± SEM of three replicates. Means not sharing the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$). The yield values were extrapolated from kg m^{-2}.

Performance	Treatments groups			
	Daily	Every 5 days	Every 10 days	Control
Initial weight (g)	6.25 ± 0.43	6.22 ± 0.34	6.12 ± 0.37	6.11 ± 0.38
Final weight (g)	115.6 ± 10.71$^{\mathbf{a}}$	76.93 ± 9.15$^{\mathbf{b}}$	79.90 ± 1.26$^{\mathbf{b}}$	72.97 ± 1.065$^{\mathbf{b}}$
SGR (% day^{-1})	3.44 ± 0.11$^{\mathbf{a}}$	2.97 ± 0.12$^{\mathbf{b}}$	2.99 ± 0.13$^{\mathbf{b}}$	3.06 ± 0.06$^{\mathbf{b}}$
AGR (g day^{-1})	1.30 ± 0.13$^{\mathbf{a}}$	0.84 ± 0.11$^{\mathbf{b}}$	0.88 ± 0.02$^{\mathbf{b}}$	0.80 ± 0.02$^{\mathbf{b}}$
FCR	1.22 ± 0.12$^{\mathbf{a}}$	1.85 ± 0.19$^{\mathbf{b}}$	1.88 ± 0.15$^{\mathbf{b}}$	2.21 ± 0.15$^{\mathbf{b}}$
Survival (%)	100 ± 0.0	100 ± 0.0	93.3 ± 6.66	86.7 ± 6.66
Yield (kg ha^{-1})	5780 ± 535$^{\mathbf{a}}$	3846 ± 457$^{\mathbf{b}}$	3731 ± 291$^{\mathbf{b}}$	31603 ± 236$^{\mathbf{b}}$

and fish (Carnevalli *et al*., 2006; Wang *et al*., 2008; Gonçalves *et al*., 2011; Welker & Lim, 2011); therefore, growth enhancement seems to be related to the synergistic result of multiple biological effects (Welker & Lim, 2011).





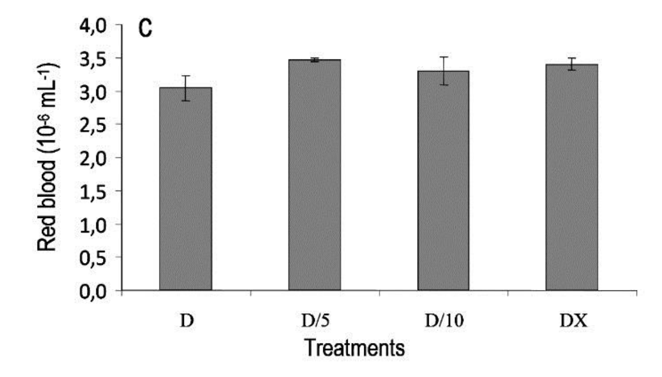


Figure 2. Hematological variables of tilapia co-cultured whith shrimp and fed with dietary supplementation of potential probiotics at different rates. a) Hematocrit percentage, b) hemoglobin, c) red blood cells (RBC). D: daily supply, D/5: every 5 days supply, D/10: every 10 days supply and DX: control without any supply. Data reported as means ± SEM of six organisms. Means not sharing the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Blood chemistry (such as plasma levels of glucose, proteins, cortisol, as well as humoral components of the immune system), and hematology (including cellular components of the immune system), of tilapia or other fish, are influenced by supplementation with probiotics. Here interpreted as higher immune response (Wang *et al*., 2008; Jatobá *et al.*, 2011), or capacity to cope with stress (Carnevalli *et al*., 2006; Gonçalves *et al*., 2011). In the present study, white blood cells, or other hematological variable related to immune function were not analyzed. Influence of PPB was not observed, regarding hematocrit, erythrocyte count, and hemoglobin content, as in a previous work with the use of *Lactobacillus plantarum* (Jatobá *et al*., 2011). The combination of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus* increased hematocrit in tilapia (Aly *et al*., 2008), while supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* decreased these variables (Goda *et al*., 2012). Protein content was not affected by the PPB, similar to the lack of effect by *Enteroccus faecium* on serum protein of tilapia (Wang *et al*., 2008), in contrast to the increase in plasma protean in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following dietary supply of *Lactobacillus rhamnosus* (Panigrahi *et al*., 2010). If any influence of the mixture of PPB enhance the immune function an increase in protein levels is expected, as shown for different immunostimulants (Choudhury *et al*., 2005; Misra *et al*., 2006). We also expected an increase in blood protein levels, reflecting a better nutritional condition, as improved protein retention in tissues was observed following administration of commercial probiotics (El-Haroun *et al*., 2006). From an analysis of blood glucose, Gonçalves *et al*. (2011) concluded that supplementation of probiotics improve the capacity of tilapia to cope with crowding stress. Because no differences in blood glucose were obtained in our study, as well as in previous studies (Welker *et al*., 2007; Jatobá *et al*., 2011), it is not clear if the mixture of PPB could result in any benefit related to minimizing stress. While triglycerides levels were not affected, a pattern of decreasing levels of serum cholesterol with increasing frequency of PPB was observed. In contrast, circulating lipids increased in rainbow trout receiving probiotics, an effect potentially associated with fish health (Panigrahi *et al*., 2010). On the other hand, a beneficial effect of probiotics on reducing blood cholesterol is well known in humans (for review, see Lye *et al*. 2009) and chicken (Mansoub, 2010). Since these benefits are associated with hypertension in humans, it does not necessarily apply to fish. Therefore, the precise meaning of cholesterol levels as a beneficial or detrimental effect from probiotics in fish remains to be established.

Previous studies show an immunostimulatory effect of the same mixture of PPB on shrimp, based on several humoral and cellular variables, such as total hemocyte count, phenoloxydase and lysosomal enzyme activity, which would explain enhanced resistance to pathogens (Peraza-Gómez *et al*., 2011; Flores-Miranda *et al*., 2011).

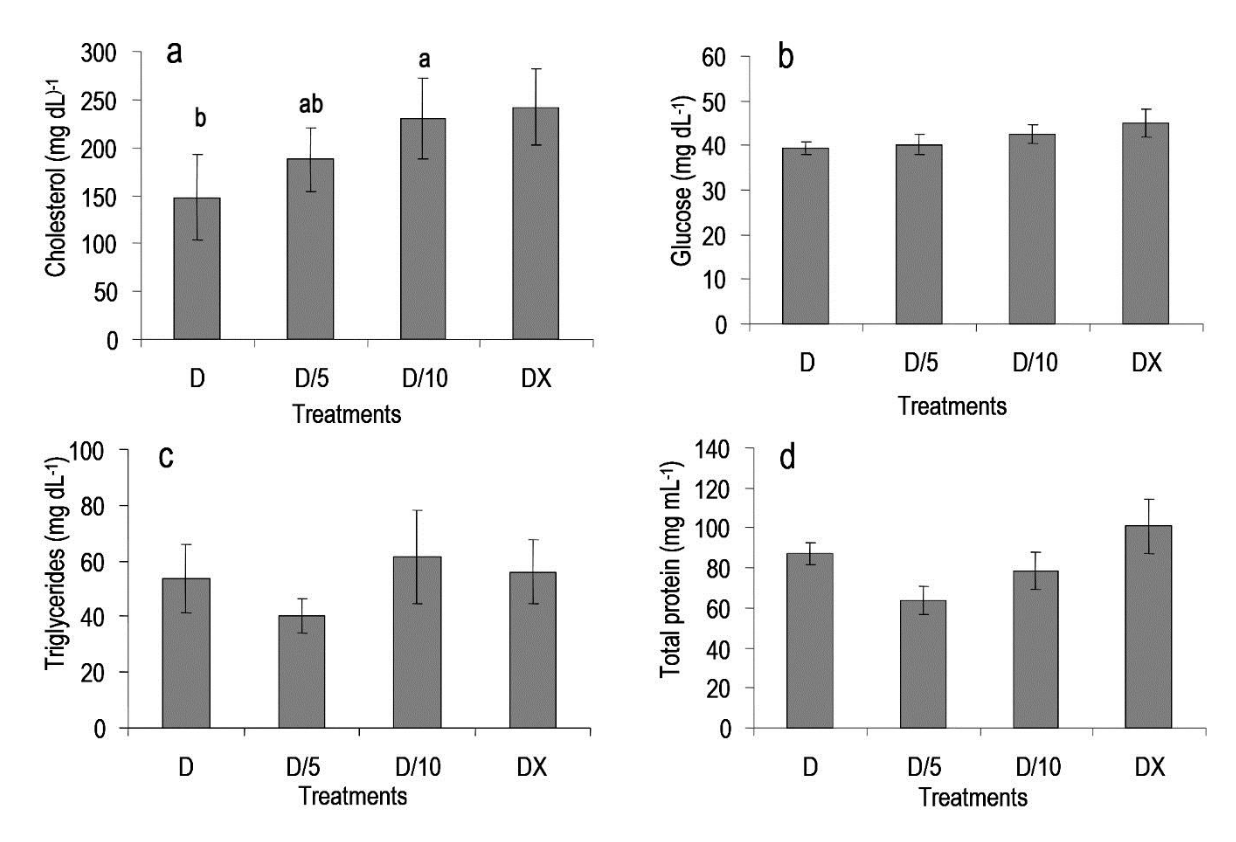


Figure 3. Biochemical variables in blood of tilapia blood co-cultured with shrimp and fed with dietary supplementation of potential probiotic bacteria at different rates. a) Cholesterol, b) glucose, c) triglycerides, d) total protein. D: daily supply, D/5: every 5 days supply, D/10: every 10 days supply and DX: control without any supply. Data reported as means ± SEM of 6 organisms. Means not sharing the same superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

However, hemolymph chemistry in shrimp has not been analyzed in relation to supplementation with probiotics. Protein levels could be related to immune function (Perazzolo *et al*., 2002; Mercier *et al*., 2006) and nutritional status (Pascual *et al*., 2003; Rosas *et al*., 2004). Therefore, as reported for tilapia (Choudhury *et al*., 2005; Misra *et al*., 2006), we expected increased protein levels in shrimp hemolymph following PPB that would explain not only increased immuno-competence, but also a better nutritional status related to enhanced growth. It is recognized that, in addition to digestion and absorption of nutrients, energy partitioning within the individual (nutrient use) is associated with increased growth (Welker & Lim, 2011). However, protein content in hemolymph was not affected by PPB supplementation; therefore, it cannot be considered a good indicator of a better immunological and nutritional status under the trial conditions of our study. A similar interpretation could be considered for hemocyanin, which is also considered an indicator of nutritional condition (Pascual *et al*., 2003) and immune function because hemocyanin has antimicrobial proprieties (Destoumieux-Garzon *et al*., 2001). Glucose levels in shrimp hemolymph is considered a good indicator of short and long-term stress (Mercier *et al*., 2009) and also as an indicator of nutritional condition (Pascual *et al*., 2003). Therefore, an increase in glucose for the trial group receiving PPB every 5 days could indicate that shrimp from this group were stressed or had better nutritional condition. Since the shrimp were not subject to any stress challenge, the first assumption is not likely to explain the results, unless joint culture induced long-term stress (high total density and high ratio of tilapia to shrimp). Short-term stress from handling during sampling is another possibility, based on the high levels of glucose (45 mg dL^{-1}), commonly observed in stressed shrimp (Racotta & Palacios, 1998; Mercier *et al.*, 2009), whereas shrimp from this group respond more abruptly or that uncontrolled stress occurred only in this group. Considering glucose as an indicator of nutritional condition, it is difficult to explain why shrimp form this group were in better condition than shrimp with daily supply, especially because no other indicator reinforced this possibility. Since triglycerides are also related to the type of feed, particularly to lipid content (Rosas *et*

al., 2004) and no effect of PPB was observed, it is assumed that no influence of PPB on assimilation of lipids from feed or lipid metabolism occurred.

From the present results, analyzing general biochemical indicators of nutritional and health status, higher performance of shrimp and tilapia with dietary supplementation of probiotics was not clearly related to such variables measured in the present work, and therefore should be analyzed on the basis of more specific indicators of digestive physiology, immune response capacity and energy balance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Adolfo Ramírez "Cuate Machado farm" for shrimp supply. Ira Fogel of CIBNOR provided editorial services. This research was supported by grants from SIP-IPN 20100176 and SEP-CONACYT 101733. Juan Pablo Apún Molina is a recipient of a CONACYT fellowship N-22906. Juan Pablo Apún Molina, Apolinar Santamaría Miranda and Antonio Luna González received support from COFAA and EDI of the Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCES

Aly, S.M., Y.A. Ahmed, A.A. Ghareeb & M.F. Mohamed. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immunol., 25: 128-136.

Apún-Molina, J.P. 2007. Efecto de bacterias con potencial probiótico en el crecimiento y supervivencia de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivada en el laboratorio. M.Sc. Thesis, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Sinaloa, 60 pp.

Apún-Molina, J.P., A. Santamaría-Miranda, A. Luna-González, S.F. Martínez-Díaz & M. Rojas-Contreras. 2009. Effect of potential probiotic bacteria on growth and survival of tilapia *Oreochromis niloticus* L., cultured in the laboratory under high density and suboptimum temperature. Aquacult. Res., 40: 887-894.

Balcázar, J.L., I.D. Blas, I. Ruiz-Z, D. Cunningham, D. Vendrell & J.L. Muzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol., 114: 173-186.

Bessa-Junior, A.P., C.M.S.B. Borges-Azevedo, F.S. Thé Pontes & G.G. Henry-Silva. 2012. Polyculture of Nile tilapia and shrimp at different stocking densities. R. Bras. Zootec., 41: 1561-1569.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-253.

Carnevalli, O., L. Vivo, R. Sulpizio, G.I. Gioacchini, I. Olivotto, S. Silvi & A. Cresci. 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture, 258: 430-438.

Choudhury, D., A.K. Pal, N.P. Sahu, S. Kumar, S.S. Das & S.C. Mukherjee. 2005. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. Fish Shellfish Immunol., 19(2005): 281-291.

Cruz, P.S., M.N. Andalecio, R.B. Bolivar & K. Fitzsimmons. 2008. Tilapia shrimp polyculture in Negos Island, Philipines: a review. J. World Aquacult. Soc., 39: 713-725.

Dacie, J.V. & S.M. Lewis. 1984. Practical hematology. Churchill Livingstone, New York, 32 pp.

Destoumieux-Garzon, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet & E. Bachère. 2001. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. J. Biol. Chem., 276: 47070-47077.

El-Haroun, E.R., A.S. Goda & K. Chowdhury. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). Aquacult. Res., 37(14): 1473-1480.

Far, H.Z., C.R.B. Saad, H.M. Daud, S.A. Harmin & S. Shakibazadeh. 2009. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp *Litopenaeus vannamei*. Afr. J. Biotechnol., 8: 3369-3376.

Flores-Miranda, M.C., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, H.A. González-Ocampo, J.A. Fierro-Coronado & B.O. Partida-Arangure. 2011. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. Aquaculture, 320: 51-55.

Goda, A.M.A., H.A. Mabrouk, M.A. Wafa & T.M. El-Afifi. 2012. Effect of using baker's yeast and exogenous digestive enzymes as growth promoters on growth, feed utilization and hematological indices of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. J. Agr. Sci. Tech., B2: 15-28.

Gonçalves, A.T., M. Maita, K. Futami, M. Endo & T. Katagiri. 2011. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish. Sci., 77: 633-642.

Günther, J. & R. Jiménez-Montealegre. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y

langostino *Macrobrachium rosenbergii* en laboratorio. Rev. Biol. Trop., 52: 937-943.

Hagerman, L. 1983. Haemocyanin concentration of juvenile lobsters *Homarus gammarus* in relation to moulting cycle and feeding conditions. Mar. Biol., 77: 11-17.

Hernández-Barraza, C., J. Loredo, J. Adame & K. Fitzsimmons. 2012. Effect of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* on the growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in a sequential polyculture system. Lat. Am. J. Aquat. Res., 40(4): 936-942.

Jatobá, A., F.N. Vieira, C.C. Buglione-Neto, J.L.P. Mouriño, B.C. Silva, W.Q. Seiffert & E.R. Andreatta. 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. Fish Physiol. Biochem., 37: 725-732.

Li, J., B. Tan, K. Mai, Q. Ai, W. Zhang, Z. Liufu & W. Xu. 2008. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthobacter* XE- in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc., 39: 477-489.

Liu, K.-F., C.H. Chiu, Y.-L. Shiu, W. Cheng & C.H. Liu. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol., 28: 837-844.

Luna-González, A., D. Quiñónez-Zúñiga, J.A. Fierro-Coronado, H.A. González-Ocampo, Á.I. Campa-Córdova, M. Flores-Miranda & V. Peraza-Gómez. 2013. Effect of *Pediococcus parvulus* and *Candida parapsilosis* on growth and survival of tilapia, *Oreochromis niloticus* and *Oreochromis* sp. Afr. J. Microbiol. Res., 7: 2976-2982.

Lye, H.S., C.Y. Kuan, J.A. Ewe, W.Y Fung & M.T. Liong. 2009. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, rennin, and phytoestrogens. Int. J. Mol. Sci., 10: 3755-3775.

Mansoub, N.H. 2010. Effect of probiotic bacteria utilization on serum cholesterol and triglycerides contents and performance of broiler chickens. Global Vet., 5(3): 184-186.

Mercier, L., E. Palacios, A.I. Campa-Cordova, D. Tovar-Ramirez, R. Hernández-Herrera & I.S. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture, 258: 633-640.

Mercier, L., G. Yepiz-Plascencia, A. Muhlia-Almazán, R. Civera, M.F. Quiñones-Arreola & E. Palacios. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. Aquacult. Res., 40: 1849-1863.

Misra, C.K., B.K. Das, S.C Mukherjee & P. Pattnaik. 2006. Effect of multiple injections of b-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. Fish Shellfish Immunol., 20: 305-319.

Muangkeow, B., K. Ikejima, S. Powtongsook & Y. Yi. 2007. Effects of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L., stocking density on growth, nutrient conversion rate and economic return in integrated closed recirculation system. Aquaculture, 269: 363-376.

Pascual, C., G. Gaxiola & C. Rosas. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. Mar. Biol., 142: 735-745.

Panorama Acuícola Magazine. 2010. Rentabilidad y perspectivas del cultivo de tilapia en México. Panorama Acuícola Magazine, Directorio de Proveedores, pp. 4-7.

Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh & T. Watanabe. 2010. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Physiol. Biochem., 36: 969-977.

Peraza-Gómez, V., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, M. López-Meyer, J.A. Fierro-Coronado & P. Alvarez-Ruiz. 2009. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. Aquacult. Res., 40: 1481-1489.

Peraza-Gómez, V., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, J.A. Fierro-Coronado, H.A. González-Ocampo & J.C. Sainz-Hernández. 2011. Dietary microorganism and plant effects on the survival and immune response of *Litopenaeus vannamei* challenged with the white spot syndrome. Aquacult. Res., 42: 559-570.

Perazzollo, L.M., R. Gargioni, P. Ogliari & M.A. Barracco. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture, 214: 19-33.

Racotta, I.S. & E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc., 29: 351-356.

Racotta, I.S. & R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comp. Biochem. Phys. A, 125: 437-443.

Racotta, I.S., E. Palacios & L. Méndez. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp *Penaeus vannamei*. Mar. Fresh. Behav. Phys., 35: 269-275.

Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul & P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191: 271-288.

Rodríguez-Grimón, R.O. 2003 La tilapia y su efecto en la prevalencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón, Master Tesis Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, 72 pp.

Rosas, C., E.L. Cooper, C. Pascual, R. Brito, R. Gelabert, T. Moreno, G. Miranda & A. Sánchez. 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations Crustacea Penaeidae. Mar. Biol., 145: 401-413.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (CONAPESCA). 2012. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011, Mazatlán, 23 pp.

Strickland, J. & T.R. Parsons. 1972 A practical handbook of sea water analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can., 167: 1-130.

Thien, C.P., Y. Yi & K. Fitzsimmons. 2004. Effects of adding shrimp *Penaeus monodon* into intensive culture ponds of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at different densities. In: R. Bolivar, G. Mair & K. Fitzsimmons (eds.). New dimensions in farmed tilapia. Proceedings of ISTA, Manila, Philippines, Bureau of Fisheries and Aquatic Resources. pp. 790-805.

Wang, Y.B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 269: 259-264.

Wang, Y.B., Z.Q. Tian, J.T. Yao & W.F. Li. 2008. Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on tilapia *Oreochromis niloticus* growth performance and immune response. Aquaculture, 277: 203-207.

Welker, T., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy & P. Klesius. 2007. Growth, immune function, disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed graded levels of bovine lactoferrin. Aquaculture, 262: 156-162.

Welker, T. & C. Lim. 2011. Use of probiotics in diets of tilapia. J. Aquacult. Res. Develop., S1: 014. doi:10.4172/2155-9546.S1-014.

Ziaei-Nejad, S., M. Habibi-Rezaei, G. Azari-Takami, D.L. Lovett, A.R. Mirvaghefi & M. Shakouri. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252: 516-524.

Zokaeifar, H., J.L. Balcázar, C.R. Saad, M.S. Kamarudin, K. Sijam, A. Arshad & N. Nejat. 2012. Effects on *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol., 33: 683-689.

Received: 12 September 2013; Accepted: 12 November 2014

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 446-456, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-6

Research Article

Análisis demográfico de tres poblaciones de *Zidona dufresnei* localizadas en el Atlántico sudoccidental

Alonso I. Medina[1,2,3], M. Alejandra Romero[1,2,3], Claudio Bidau[4] & Maite A. Narvarte[1,2,3]
[1]Instituto de Biología Marina y Pesquera Almirante Storni (IBMPAS), Güemes 1030
8520 San Antonio Oeste, Río Negro, Argentina
[2]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
Rivadavia 1917, 1033 Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina
[3]Escuela Superior de Ciencias Marinas, Universidad Nacional del Comahue
San Martín 247, 8520 San Antonio Oeste, Río Negro, Argentina
[4]Paraná y Los Claveles 3304, Garupá, Misiones, Argentina
Corresponding author: Alonso I. Medina (alonsoim@gmail.com)

RESUMEN. El estudio de los patrones demográficos en especies que soportan una presión pesquera es fundamental para la conservación y manejo de sus poblaciones. *Zidona dufresnei* es un caracol marino endémico del Atlántico sudoccidental, y es una de las principales especies capturadas por la pesca artesanal. Además se caracteriza por las marcadas diferencias entre sus poblaciones respecto a la talla máxima alcanzada. El objetivo de este estudio fue evaluar la estructura poblacional y los patrones morfogravimétricos intra- e interpoblacionales en tres localidades distribuidas a lo largo del Mar Argentino (Mar del Plata, Golfo San Matías, Bahía San Antonio). El rango de tallas varió entre 80 y 230 mm. Los ejemplares más pequeños correspondieron a la Bahía de San Antonio, mientras que los más grandes al Golfo San Matías. En todos los casos, las distribuciones de frecuencias de tallas y pesos siguieron una distribución unimodal. No se encontraron diferencias significativas en los pesos y tallas entre sexos. El ancho, largo y peso total de los ejemplares difirieron significativamente entre los tres sitios tanto en la prueba global como en las comparaciones *a posteriori*. La proporción de sexos no difirió de 1:1. Los resultados obtenidos en este estudio ampliaron el rango de distribución batimétrica de *Z. dufresnei*, estableciendo su variación entre 0 y 120 m. Además, se registró una nueva talla máxima de 230 mm para esta especie en el Mar Argentino. Las diferencias entre las tres poblaciones estudiadas se deberían a las presiones ambientales locales o a un flujo génico interrumpido o reducido.

Palabras clave: *Zidona dufresnei*, molusco, gastrópodo, demografía, Argentina, Atlántico sudoccidental.

Demographic analysis among three populations of *Zidona dufresnei* from the southwestern Atlantic

ABSTRACT. Study of demographic patterns in species that support a fishing pressure is essential for the conservation and management of their populations. *Zidona dufresnei* is an endemic marine snail from the southwestern Atlantic, and is one of the main species caught by artisanal fisheries. It is also characterized by marked differences between its populations in terms of the maximum length attained. The aim of this study was to assess the population structure and morphogravimetric variations (intra- and interpopulations) in three locations distributed along the Argentine Sea (Mar del Plata, San Matias Gulf, San Antonio Bay). The size ranges varied between 80 and 230 mm. The smallest specimens corresponded to San Antonio Bay, while the largest ones to San Matias Gulf. In all cases, the frequency distributions of length and weight followed a unimodal distribution. No differences in weight and size between sexes were found. The width, length, and total weight of the specimens differed significantly among the three sites in both overall test and posteriori comparisons. The sex ratio did not differ from 1:1. The results obtained in this study allowed expanding the depth distributional range of *Z. dufresnei* from 0 to 120 m. In addition, a new maximum size for the species of 230 mm was recorded for the Argentine Sea. The differences found among the three populations studied may be due to local environmental pressures or an interrupted or reduced gene flow.

Keywords: *Zidona dufresnei*, gastropod, mollusk, demography, Argentina, southwestern Atlantic.

Corresponding editor: Cristian Aldea

INTRODUCCIÓN

En algunos gasterópodos marinos, las distintas poblaciones presentan diferencias morfológicas que se expresan a nivel de la concha; algunas se relacionan con la plasticidad fenotípica en respuesta a factores ambientales locales (Janson & Sundberg, 1983; Martel *et al.*, 1986; Yamada, 1987; Boulding & Hay, 1993; Martín-Mora *et al.*, 1995; Yeap *et al.*, 2001; Martín & Estebenet, 2002; Estebenet & Martín, 2003; Véliz *et al.*, 2003), mientras que otras responden a la variabilidad genética (Johannesson *et al.*, 1993; Chapman, 1995; Johannesson & Johannesson, 1996; Carballo *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2001). Más allá del origen de esta variabilidad, esto da como resultado patrones morfo-gravimétricos característicos para cada una de las poblaciones, los cuales tienen importancia desde el punto de la conservación y el manejo de las poblaciones.

Zidona dufresnei Donovan, 1823 (Gastropoda: Volutidae) es un caracol marino endémico del suroeste del Océano Atlántico, que habita desde Río de Janeiro, Brasil (22ºS), hasta aguas norpatagónicas, en el Golfo San Matías, Argentina (42ºS) (Kaiser, 1977). La distribución batimétrica descrita para la especie varía desde aguas costeras someras (0-4 m) hasta aguas profundas (90 m) (Kaiser, 1977; Scarabino, 1977; Pereyra *et al.*, 2009). Es un caracol longevo que llega a vivir hasta 18 años, con una talla máxima de 250 mm reportada en ejemplares de la costa de Uruguay (Riestra & Fabiano, 2000; Giménez *et al.*, 2004). La fecundación es interna, el desarrollo directo y las ovicápsulas son fijadas a un sustrato selecto, principalmente cantos rodados de más de 45 cm^3 (Clavijo *et al.*, 2005; Pereyra *et al.*, 2009). Estos rasgos particulares de la historia de vida de esta especie sólo sugieren una distribución en forma de parches.

En Argentina y Uruguay, *Z. dufresnei* es una de las principales especies capturadas por la pesca costera artesanal, con volúmenes máximos desembarcados de ~1.300 ton anuales en Argentina; mientras que en Uruguay, el desembarque anual no sobrepasa las 1.000 ton (Fabiano *et al.*, 2000; Giménez *et al.*, 2004; Clavijo *et al.*, 2005, Torraglosa & Giménez, 2010). No obstante en Argentina, en los últimos años se ha registrado una caída significativa en los desembarques, con volúmenes de ~100 ton (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. www.minagri.gob.ar/ SAGPyA/pesca/index.php). Esta caída en los desembarques estaría asociada a cambios generados a partir del impacto de la pesca dado que, como en la mayoría de los volútidos, las características biológicas de esta especie (longevidad mayor a 17 años, inicio de la maduración a los 8-9 años, baja tasa de crecimiento), la hacen vulnerable a episodios de sobre-explotación (Giménez & Penchaszadeh, 2002, 2003; Penchaszadeh *et al.*, 2008; Roche *et al.*, 2013). Sumado a esto, la explotación comercial de esta especie se ha realizado históricamente sin un marco regulatorio específico.

Existen antecedentes de estudios sobre la estructura demográfica de las poblaciones de *Z. dufresnei* en el Mar Argentino, aunque ninguno de ellos lo hizo de manera comparativa entre distintos ambientes. Pereyra *et al.* (2009) y Roche (2013) estudiaron la población de la Bahía San Antonio, observando una talla promedio de 93,96 ± 6,07 mm en machos y 94,17 ± 7,06 mm en hembras. La talla máxima registrada por estos autores fue de 120,5 mm, mientras que en Mar del Plata se reportaron tallas máximas de 210 mm (Giménez *et al.*, 2004, 2005). Por otro lado, Scarabino (1977) estudió la población de profundidad del Golfo San Matías, encontrando tallas más grandes que las reportadas para las áreas más costeras. La talla de primera madurez en las hembras de la población de la Bahía San Antonio se estimó en 90 mm (Roche *et al.*, 2013). En el caso de Mar del Plata, la talla de primera madurez se estimó en 150-160 mm (Giménez, 2003; Giménez & Penchaszadeh, 2003; Giménez *et al.*, 2004), aunque posteriormente se observó una disminución en la talla, registrando 131 mm en hembras y 128 mm en machos (Torroglosa & Giménez, 2010). Con respecto a la proporción de sexos, en todas las poblaciones analizadas se encontró una proporción equilibrada de machos y hembras (Giménez & Penchaszadeh, 2002; Pereyra *et al.*, 2009).

Las diferencias en el ciclo reproductivo y la morfología entre la población de la Bahía San Antonio (talla máxima de 120,5 mm, Pereyra *et al.*, 2009) y Mar del Plata (talla máxima de 210 mm, Giménez *et al.*, 2004), llevó a postular la existencia de dos morfotipos: un morfotipo normal (Mar del Plata) y un morfotipo enano (Bahía San Antonio) (Lahille, 1895; Forcelli, 2000). Incluso, Lahille (1895) hace referencia a un volútido pequeño identificado como *Voluta angulata affinis*, que se trataría de un ejemplar de la población de *Z. dufresnei* proveniente de la costa de la provincia de Río Negro. Posteriormente, Clench & Turner (1964) unificaron la variedad *V. angulata affinis* junto con *Z. dufresnei*, generando inconsistencias taxonómicas.

Z. dufresnei es un modelo ideal para analizar variaciones espaciales en los patrones morfológicos, puesto que ciertas características de su historia de vida (fecundación interna, desarrollo directo, oviposición en sustratos de preferencia) y el restringido rango de dispersión espacial, provocarían una reducción del flujo génico entre diferentes poblaciones, lo que conduciría a adaptaciones locales particulares. Esto se expresaría a nivel de tamaño como peso de los individuos. En este

contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la estructura poblacional y los patrones morfogravimétricos intra- e interpoblacionales en tres localidades distribuidas a lo largo del Mar Argentino. Este objetivo aportará a dilucidar el estatus taxonómico de las poblaciones en estudio y aportará información esencial para avanzar hacia el desarrollo de una estrategia de manejo de sus poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio se extiende desde la provincia de Buenos Aires (38°20’S, 57°37’W) hasta el Golfo San Matías (40°50'-42°15'S, 63°05'-65°10'W) a lo largo de la plataforma continental Argentina. En esta área se relevaron tres poblaciones: en el extremo norte la población de Mar del Plata (MDQ), y dentro del golfo San Matías, la población de la Bahía San Antonio (BSA) y la población de aguas profundas (GSM) (Fig. 1).

El sitio de muestreo correspondiente a MDQ se halla sobre fondos arenosos, con un rango de temperatura media superficial entre 9 y 17°C y una salinidad promedio de 35 (Guerrero *et al.*, 1997). El GSM es el más extenso de los golfos norpatagónicos, con 19.700 km^2 de superficie, es una cuenca caracterizada por profundidades máximas de 160 a 200 m en el sector central y profundidades en su boca de 45 a 65 m (Mazio & Vara, 1983). El fondo marino en su mayoría es de arena y limo. La salinidad varía entre 33,5 y 34,1 y la temperatura media superficial de 11,3-13,5°C (Williams *et al.*, 2006). El GSM es una zona de alta productividad, relacionada principalmente con ciertos procesos oceanográficos inherentes que aceleran la productividad primaria y, en consecuencia, también la productividad secundaria (Williams, 2004).

Asimismo, representa la zona de transición entre las dos provincias biogeográficas del Mar Argentino: Argentina y Magallánica (Menni & Stehmann, 2000; Balech & Ehrlich, 2008). Por último, la BSA, ubicada en el extremo noroeste del GSM, es un ambiente macromareal poco profundo, con mareas semidiurnas y un sistema de canales expuestos a fuertes corrientes de marea. Presenta una superficie total ~80 km^2 (Daleo *et al.*, 2006) y se comunica con las aguas del Golfo San Matías mediante una boca de ~5 km de ancho. El rango anual de temperatura es de 6-28ºC. La circulación del agua se caracteriza por una baja tasa de renovación. La escasez de lluvias, ausencia de aportes de agua dulce y elevada tasa de evaporación determinan mayores salinidades que en zonas aledañas (34 a 39) (Piola & Scasso, 1988). El tipo de fondo dominante es arena y canto rodado (Escofet *et al.*, 1977).

Recolección de las muestras

El periodo de estudio se extendió de 2007 a 2011, con muestras obtenidas a lo largo del año sin una periodicidad específica. En BSA, las muestras fueron obtenidas a partir de la captura diaria de un pescador artesanal experimentado que opera frecuentemente en el sector intermareal (0-1 m de profundidad). La modalidad extractiva consiste en la utilización de un gancho de hierro (30-40 cm de longitud). En la zona profunda del Golfo San Matías, los ejemplares fueron obtenidos desde las capturas comerciales de barcos arrastreros dirigidos a la captura de *Merluccius hubbsi*. El tipo de barco utilizado al interior del golfo es el arrastrero de tamaño mediano (18 a 25 m de eslora). El arte de pesca consiste en una red de arrastre de fondo con un tamaño de malla de 120 mm. La profundidad típica a partir de la cual se obtuvieron ejemplares de *Z. dufresnei* promedió 100 m de profundidad. En MDQ, los ejemplares fueron obtenidos de la pesca de arrastre comercial dirigida a la captura de *Z. dufresnei*. Las embarcaciones que operan desde el puerto de Mar del Plata tienen una eslora promedio de 20-26 m y el arte de pesca empleado consiste en una red de arrastre de fondo con un tamaño de malla de 42 mm. La profundidad de arrastre varió entre 40 y 60 m.

Procesamiento de las muestras y análisis de los datos

Se analizó la proporción de sexos y la variación en las medidas morfogravimétricas de un conjunto de datos compuesto por 267 especímenes provenientes de las tres poblaciones estudiadas (BSA: 79 individuos, GSM: 81 individuos, MDQ: 107 individuos). No obstante, para la comparación de las tallas y pesos medios, el tamaño de la muestra fue ligeramente inferior debido a que algunos ejemplares presentaban roturas o estaban incompletos (Tabla 2).

De cada ejemplar capturado se registró: sexo, longitud total de la concha (LT, mm), ancho total (AT, mm) y peso total (PT, g). Para caracterizar la estructura demográfica en cada sitio se construyeron distribuciones de frecuencias de tallas (DFT) y pesos (DFP). Estas distribuciones se compararon entre sexos y sitios mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras independientes. Los valores medios de longitud y ancho de la concha y peso total de los individuos se compararon entre sitios mediante un ANOVA de una vía. Se realizaron comparaciones *a posteriori* (LSD Fisher) para identificar las diferencias entre los sitios. También se efectuaron comparaciones para las medias de longitud, ancho y peso total de los individuos entre sexos mediante la prueba *t* en cada una de las poblaciones. La hipótesis nula de ausencia de diferencia en la proporción de sexos ($P_{hembras} = P_{machos} = 0,5$) en cada uno de los enclaves poblacionales se puso

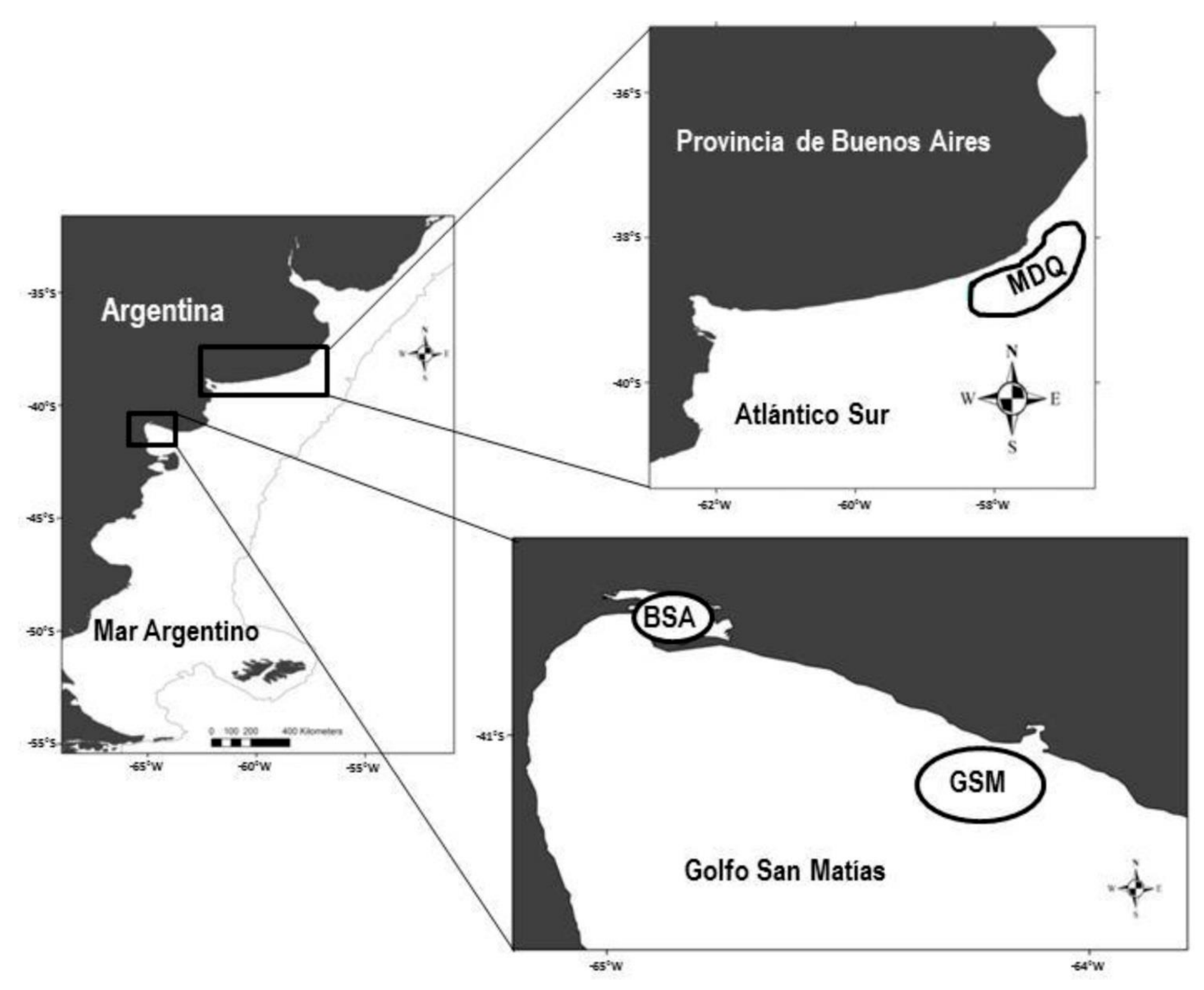


Figura 1. Sitios de muestreo. MDQ: Mar del Plata, BSA: Bahía San Antonio, GSM: Golfo San Matías.

a prueba mediante el test no paramétrico de Chi-cuadrado (χ^2). Las relaciones morfogravimétricas LT - AT y log(LT) - log(PT) se evaluaron por sexo y por sitio mediante un análisis global (ANCOVA de dos vías).

RESULTADOS

El rango de tallas varió entre 80,8 y 119,8 mm en la BSA, 145 y 230 mm en GSM y, 105 y 186 mm en los individuos provenientes de MDQ (Tabla 1). El rango de pesos entre 44,4 y 113,0 g en BSA, 387,6 y 831 g en GSM y, 61,2 y 491,3 g en MDQ. En todos los casos, las DFT y DFP se aproximaron a una distribución unimodal (Figs. 2, 3). La comparación de las distribuciones no mostró diferencias significativas entre sexos, pero sí se hallaron diferencias altamente significativas cuando se comparó entre sitios (Kolmogorov-Smirnov) (Tabla 1).

No se encontraron diferencias significativas en los pesos y tallas de los ejemplares cuando se los comparó a nivel poblacional entre sexos (prueba *t*, BSA_{LT} t_{74} = 0,45, BSA_{PT} t_{75} = 1,03, GSM_{LT} t_{74} = 0,15, GSM_{PT} t_{78} = 1,49, MDQ_{LT} t_{84} = 1,31, MDQ_{PT} t_{86} = 0,69; $P > 0,05$). De manera diferente, el ancho total de la concha sí mostró diferencias entre sexos en las poblaciones de MDQ (prueba *t*, MDQ t_{84} = -3,10; $P < 0,001$), no así en la población de BSA y GSM (prueba *t*, BSA_{AT} t_{74} = 1,96, GSM_{AT} t_{74} = 0,82; $P > 0,05$). Las variables morfogravimétricas AT, PT y LT difirieron significativamente entre los tres sitios tanto en la prueba global como en las comparaciones *a posteriori* (ANOVA, F_{PT} = 845,66, F_{LT} = 1058,04, F_{AT} = 348,73; $P < 0,001$).

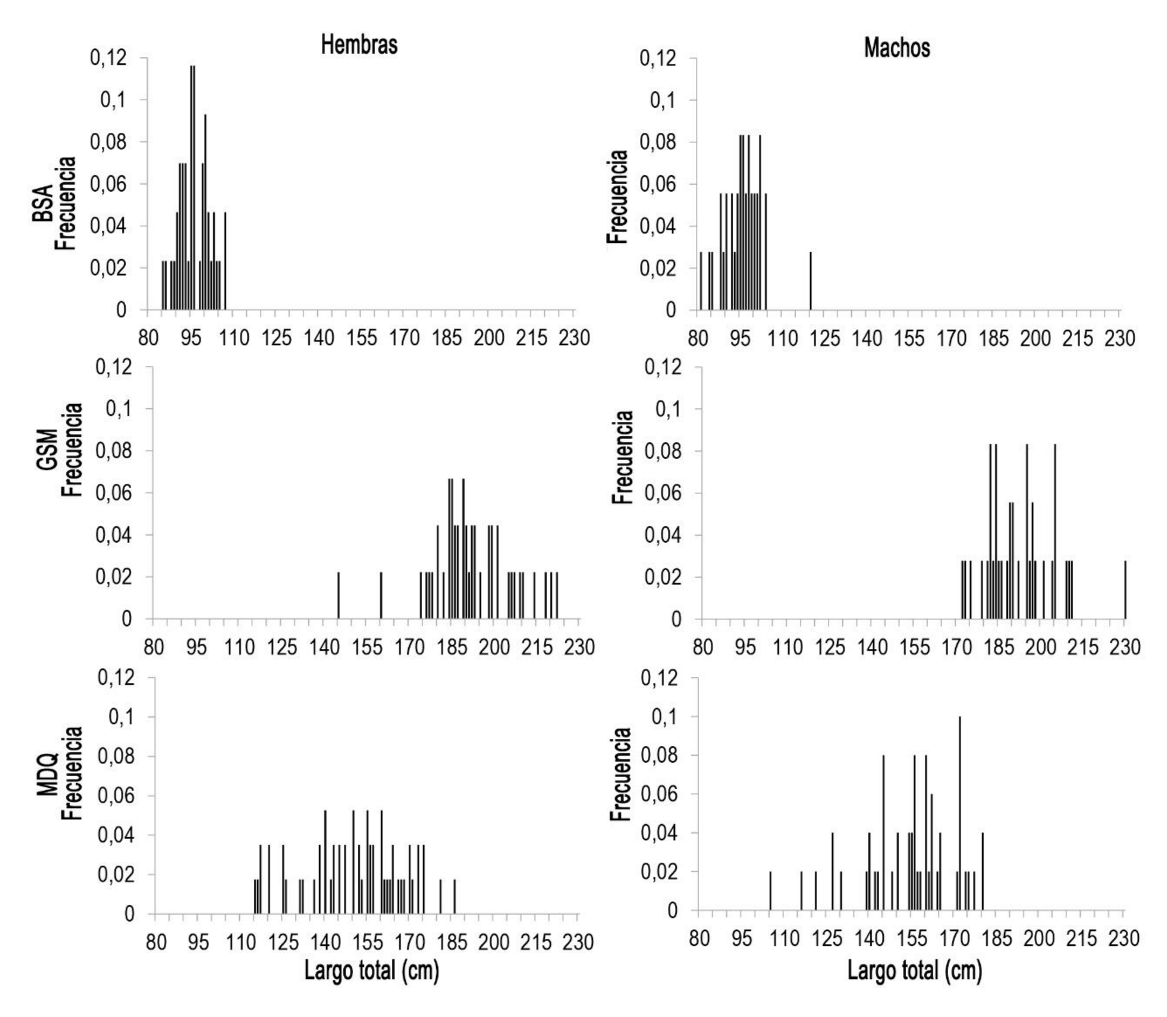


Figura 2. Distribución de frecuencias relativas de tallas, discriminadas por sexo, en las tres poblaciones de *Zidona dufresnei* (BSA: Bahía San Antonio, GSM: Golfo San Matías, MDQ: Mar del Plata).

Los caracoles más grandes se encontraron en el GSM (talla media: 191,8 mm), los más pequeños en la BSA (talla media: 95,6 mm) y rangos intermedios (talla media: 152,2 mm) en MDQ (Tabla 2). No se registraron diferencias significativas en las proporciones de sexos en ninguna de las tres poblaciones (χ^2_{BSA} = 0,62, P = 0,43; χ^2_{GSM} = 1,00, P = 0,32; χ^2_{MDQ} = 0,60, P = 0,44).

El análisis global para evaluar las relaciones morfogravimétricas entre AT (mm) - LT (mm) y Log(PT) – Log(LT) considerando todas las interacciones (*full model*) entre la covariable (LT) y los factores (sexo y sitio), no mostró diferencias significativas entre sexos (ANCOVA de dos vías, $P >$ 0,05, Tabla 3). No obstante, para MDQ, la diferencia detectada respecto de la media del ancho total entre machos y hembras se tradujo en un nivel de significancia <0,05 del término de interacción sexo x sitio (Tabla 3). Más allá de este resultado particular, los siguientes análisis fueron realizados combinando los datos de machos y hembras dado que el sexo no tuvo, generalmente, un efecto significativo sobre las variables respuestas. La comparación de las rectas para la relación AT-LT y log(PT)-log(LT) entre las poblaciones de BSA y GSM y entre las poblaciones de GSM y MDQ indicó diferencias en sus pendientes por lo que no se prosiguió con el análisis (β BSA ≠ β GSM, P < 0,05; β GSM ≠ β MDQ, P < 0,05). Las rectas estimadas para las poblaciones de BSA y MDQ fueron paralelas y no coincidentes tanto para la relación AT-LT como para log(PT) – log(LT), indicando que las diferencias en el AT y PT entre sitios permanecen a pesar de incluir LT en el análisis (ANCOVA, P < 0,0001) (Figs. 4, 5).

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se amplió el rango de distribución batimétrica de *Zidona dufresnei*, estableciendo su variación entre 0 m (individuos expuestos durante la bajamar, Bahía San Antonio)

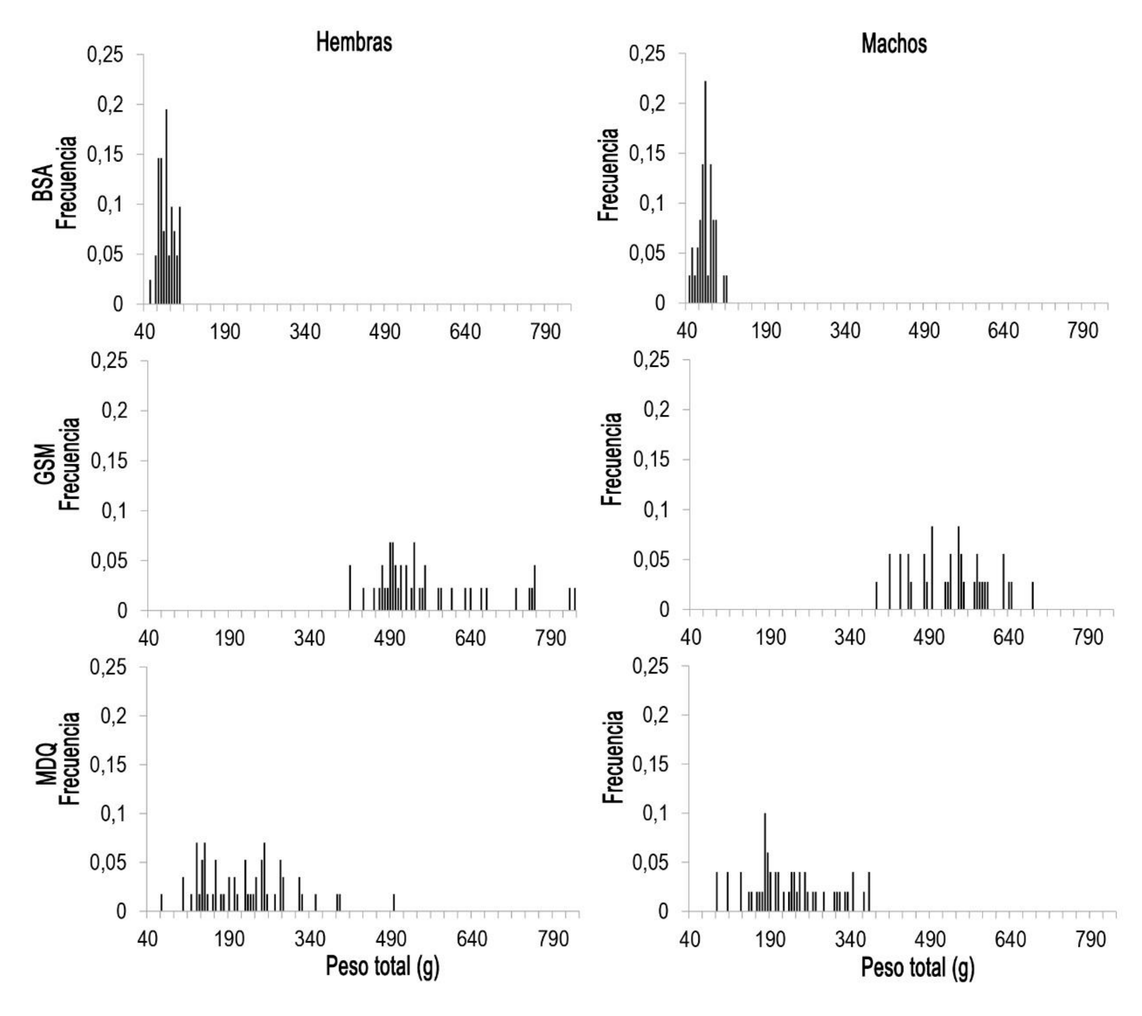


Figura 3. Distribución de frecuencias relativas de pesos, discriminadas por sexo, en las tres poblaciones estudiadas de *Zidona dufresnei* (BSA: Bahía San Antonio, GSM: Golfo San Matías, MDQ: Mar del Plata).

Tabla 1. Resultados de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov para las distribuciones de frecuencia de tallas y pesos, entre sexos y sitios de estudio (α = 0,05). D máx: distancia máxima; Z: pruebas de Kolmogorov-Smirnov. ***P* < 0,001, **P* < 0,05, ns: *P* > 0,05.

Comparación	D máx	Z	Significación
Distribución de frecuencia de tallas (DFT)			
Macho-hembra (BSA)	0,106	0,469	ns
Macho-hembra (GSM)	0,111	0,497	ns
Macho-hembra (MDQ)	0,166	0,858	ns
BSA-GSM	1,000	6,324	**
BSA-MDQ	0,978	6,593	**
GSM-MDQ	0,879	5,97	**
Distribución de frecuencia de pesos (DFP)			
Macho-hembra (BSA)	0,172	0,753	ns
Macho-hembra (GSM)	0,177	0,787	ns
Macho-hembra (MDQ)	0,188	0,972	ns
BSA-GSM	1,000	6,264	**
BSA-MDQ	0,940	6,292	**
GSM-MDQ	0,978	6,618	**

Tabla 2. Medidas de resumen para las variables morfogravimétricas: peso total (PT, g), longitud total (LT, mm) y ancho total (AT, mm) de *Zidona dufresnei* por sexo y sitio de muestreo (BSA: Bahía San Antonio, GSM: Golfo San Matías, MDQ: Mar del Plata). H: hembras, M: machos, T: total, DE: desviación estándar; Min: mínimo; Max: máximo. Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra (n).

		Peso total	Largo total	Ancho total
BSA - H	Media ± DE	77,5 ± 14,2 (41)	95,7 ± 5,4 (43)	44,4 ± 7,5 (43)
	Min - Max	48,6 - 104,3	84,3 - 106,6	35,5 - 75,5
BSA - M	Media ± DE	74,0 ± 15,3 (36)	95,4 + 7,0 (36)	41,6 + 3,7 (36)
	Min - Max	44,4 - 113,0	80,8 - 119,8	33,9 - 50,9
BSA - T	Media ± DE	75,9 ± 14,7 (77)	95,6 ± 6,1 (79)	43,1 ± 6,2 (79)
	Min - Max	44,4 - 113,0	80,8 - 119,8	33,9 - 75,5
GSM - H	Media ± DE	560,5 ± 109,2 (44)	191,4 ± 14,7 (45)	64,8 ± 6,1 (45)
	Min - Max	413,1 - 831,0	145,0 - 222,0	43,4 - 75,0
GSM - M	Media ± DE	528,6 ± 73,3 (36)	192,2 ± 12,3 (36)	62,7 ± 6,9 (36)
	Min - Max	387,6 - 684,3	172,0 - 230,0	38,0 - 76,38
GSM - T	Media ± DE	547,0 ± 95,8 (80)	191,8 ± 13,7 (81)	63,7 ± 6,4 (81)
	Min - Max	387,6 - 831,0	145,0 - 230,0	38,0 - 76,8
MDQ - H	Media ± DE	212,0 ± 83,8 (58)	149,3 ± 18,7 (58)	51,6 ± 8,7 (58)
	Min - Max	61,2 - 491,3	105,0 - 186,0	25,4 - 85,0
MDQ - M	Media ± DE	225,4 ± 72,7 (49)	155,3 ± 15,2 (49)	53,4 ± 6,5 (49)
	Min - Max	87,9 - 373,3	116,0 - 180,0	38,0 - 65,0
MDQ - T	Media ± DE	219,1 ± 78,8 (107)	152,2 ± 17,4 (107)	52,6 ± 7,7 (107)
	Min - Max	61,2 - 491,3	105,0 - 186,0	25,4 - 85,0

hasta 120 m en las profundidades del Golfo San Matías. Hasta la actualidad, las profundidades máximas reportadas señalaban 90 m de profundidad (Scarabino, 1977).

Los resultados del análisis de la estructura poblacional y los patrones morfogravimétricos de *Z. dufresnei* mostraron diferencias entre los tres sitios estudiados, Bahía San Antonio, Golfo San Matías y Mar del Plata. Cada una de las poblaciones presentó distribuciones y rangos de tallas, pesos y relaciones morfométricas particulares.

Los ejemplares más pequeños respecto de todas las variables evaluadas fueron los de la población de la BSA, mientras que los individuos más grandes dentro de la muestra fueron aquellos colectados en las zonas profundas del GSM, siendo significativamente más largos, anchos y pesados que los de las otras dos localidades. Si bien los métodos de captura pudieron subestimar las tallas menores, las comparaciones de las tallas máximas son válidas. Esto permitió identificar dos morfotipos: un morfotipo pequeño o enano de zonas costeras como es el caso de la Bahía San Antonio y un morfotipo grande de zonas profundas del Golfo San Matías y Mar del Plata.

La talla máxima registrada en este estudio fue de 230 mm para ejemplares provenientes de GSM. Este valor está por encima del máximo reportado para esta especie por Giménez *et al.* (2004) en el Mar Argentino, quienes ubicaron al extremo superior en 210 mm trabajando con individuos de MDQ. Sin embargo, comparando específicamente las muestras de esta población, la talla máxima observada en este estudio para MDQ fue un 20% menor a la registrada por esos autores. En el caso de la BSA, donde los ejemplares fueron significativamente más pequeños que los de las otras dos poblaciones, la talla máxima encontrada fue aún menor que la talla mínima observada para el GSM (las distribuciones de frecuencias de tallas de ambas poblaciones no se solaparon en absoluto). Pereyra *et al.* (2009) analizaron la población de BSA y, aunque el rango de tallas considerado fue ligeramente más amplio, la talla máxima reportada fue similar a la observada en este estudio (Pereyra *et al.*, 2009: 120,5 mm; este estudio: 119,3 mm).

Respecto de la talla media, los valores obtenidos fueron coincidentes con los valores ya publicados para sendas poblaciones. En BSA, Pereyra *et al.* (2009) indicaron una media de 94,3 mm y, en MDQ, Giménez *et al.* (2004) observaron un promedio de 159,8 mm; mientras que en este estudio las medias fueron de 95,6 mm y 152,2 mm, respectivamente. Para la población del GSM, no se dispone de información previa, por lo tanto este estudio representaría la primera descripción de esta población en términos demográficos. Scarabino (1977) sólo había reportado que en las zonas profundas del GSM las tallas eran superiores a las encontradas en

Tabla 3. ANCOVA de dos vías para evaluar el efecto del sexo y sitio (factores) sobre el ancho total (AT, mm) y el peso total (PT, g), incluyendo la longitud total (LT, mm) como covariable. En el caso del peso total, tanto la covariable como la variable respuesta fueron transformadas con log10.

AT = LT * Sexo * Sitio			
Fuente de variación	df	MS	*F*
LT	1	22637,4	1969,5 **
Sexo	1	5,4	0,5 ns
Sitio	2	437,1	38,0 **
LT x sexo	2	9,9	0,9 ns
LT x sitio	2	108,8	9,5 **
Sexo x sitio	2	259,6	22,6 **
LT x sexo x sitio	2	2,3	0,3 ns
Error	226	11,5	
log(PT) = log(LT) * Sexo *Sitio			
log(LT)	1	28,870	5373,1 **
Sexo	1	0,0035	0,652 ns
Sitio	2	0,6981	129,9 **
log(LT) x sexo	2	0,0001	0,002 ns
log(LT) x sitio	2	0,0311	5,782 *
Sexo x sitio	2	0,0068	1,264 ns
log(LT) x sexo x sitio	2	0,0006	0,108 ns
Error	223	0,0054	

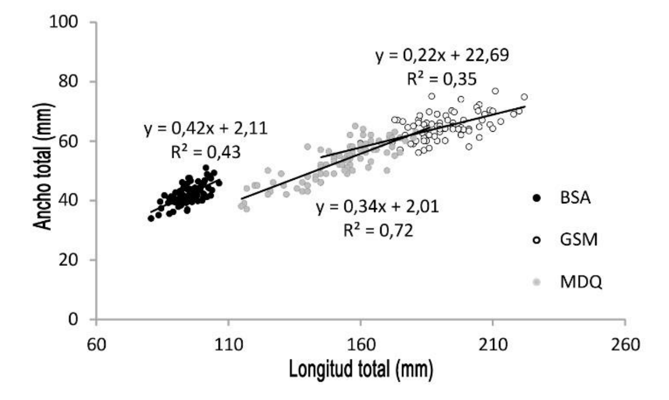


Figura 4. Relación entre el ancho total de la concha y el longitud total para cada una de las poblaciones de *Zidona dufresnei* (BSA: Bahía San Antonio, GSM: Golfo San Matías, MDQ: Mar del Plata). Se presentan las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas para cada sitio.

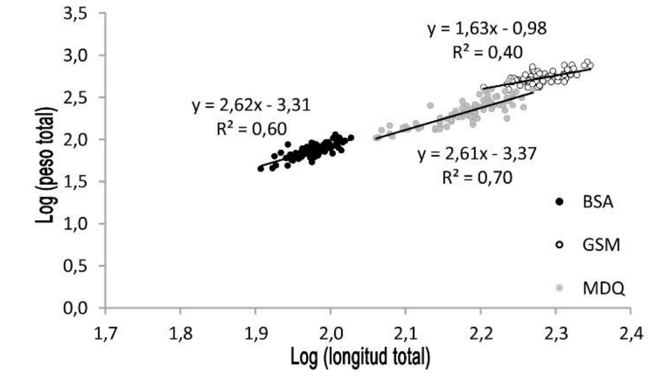


Figura 5. Relación entre el log (peso total) y el log (longitud total) para cada una de las poblaciones de *Zidona dufresnei* (BSA: Bahía San Antonio, GSM: Golfo San Matías, MDQ: Mar del Plata). Se presentan las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas para cada sitio.

las zonas costeras, pero no aportó información cuantitativa al respecto.

Las distribuciones de frecuencias de tallas y pesos se aproximaron a una distribución unimodal en los tres sitios de estudio, con modas cercanas a las observadas con anterioridad (BSA: 95 mm, Pereyra *et al.*, 2009; MDQ: 170 mm, Giménez *et al.*, 2004). Estas distribuciones estuvieron acotadas a las tallas accesibles al arte de pesca, por esa razón no se incluyeron individuos juveniles en la muestra. Esta limitación también fue reportada en los estudios de Giménez *et al.* (2004) y Pereyra *et al.* (2009), los cuales se basaron en los mismos métodos de captura que los empleados en este estudio en cada una de las poblaciones.

A nivel intrapoblacional, no se encontraron diferencias significativas entre sexos ni en las tallas y pesos medios, ni en las distribuciones de frecuencias de ambas variables en las tres poblaciones estudiadas de *Z.*

dufresnei. Sin embargo, respecto del ancho total, sí se detectaron diferencias en las muestras provenientes de MDQ. Los machos fueron significativamente más anchos que las hembras, contrario a lo reportado por Pereyra *et al.* (2009) para BSA. Por otro lado, se demostró que la proporción de sexos no difirió de 1:1 en ninguna de las poblaciones estudiadas. Estos resultados son coincidentes a lo publicado previamente. Pereyra *et al.* (2009) estudiando la población de BSA y Giménez *et al.* (2004), analizando ejemplares de MDQ, no encontraron un desplazamiento de la relación 1:1 en la proporción de sexos y tampoco señalaron diferencias en las distribuciones de frecuencias de tallas entre machos y hembras.

El análisis de las relaciones morfogravimétricas entre el ancho, peso y largo total son un indicador de la forma en que crecen los individuos. En *Z. dufresnei* por cada incremento en el largo se registró un aumento de la misma magnitud en el ancho. En el caso de las variables peso y largo total, la relación fue una función de tipo potencial, indicando alometría negativa (<3) (IC β BSA: 2,12-2,98, IC β GSM: 1,16-2,10; IC β MDQ 2,24-2,98). Las diferencias entre las poblaciones respecto de las variables estudiadas se mantuvieron a pesar de incorporar al largo total como una covariable en el análisis morfométrico; lo que sugiere que además de la variación atribuida al tamaño estarían actuando otros factores como podría ser un cambio en la forma. Cuando se consideró al sexo como factor en al análisis global, los resultados fueron coherentes con lo encontrado a partir de la comparación de las medias.

Las diferencias en tamaño entre poblaciones de gasterópodos de una misma especie que habitan dentro y fuera de la Bahía San Antonio ya fueron reportadas con anterioridad. Narvarte *et al.* (2008) y Avaca (2010), estudiando tres poblaciones del caracol globoso *Buccinanops globulosum* (Bahía San Antonio, Playa Villarino ubicada al este de la BSA y Bahía Nueva en el Golfo Nuevo), encontraron que los ejemplares residentes de la BSA fueron significativamente más pequeños que en las otras dos poblaciones localizadas fuera de la bahía. Dichas autoras indicaron que las variaciones observadas serían de base eco-fenotípica, determinadas por las condiciones ambientales características de cada sitio.

En el caso de *Z. dufresnei*, las diferencias halladas entre las tres poblaciones analizadas se podrían deber a presiones ambientales locales (plasticidad fenotípica) o a un flujo génico interrumpido o reducido. Las poblaciones de organismos que habitan las zonas intermareales (BSA) están sometidas a condiciones ambientales variables (rangos amplios de temperatura, exposición al oleaje), comparadas con las de un ambiente mucho más homogéneo característico de aguas relativamente más profundas (GSM y MDQ), lo cual podría explicar parcialmente las grandes diferencias encontradas en términos demográficos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente a Andrés Milessi (INIDEP), Alejandra Goya y Horacio Sancho (SENASA) por su colaboración en la obtención y procesamiento de los ejemplares. Este estudio fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (PID2003-N°371; PICT2006 Start-Up N°1575 and PICT CONAE-CONICET N°4, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica). Alonso Medina también agradece al Consejo Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (CONICET) por las becas doctoral y posdoctoral obtenidas.

REFERENCIAS

Avaca, M.S. 2010. Estudios comparativos de las características biológicas y de la estructura demográfica del caracol *Buccinanops globulosus* en los golfos norpatagónicos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, 198 pp.

Balech, E. & M.D. Ehrlich. 2008. Esquema biogeográfico del mar argentino. Rev. Invest. Des. Pesq., 19: 45-75.

Boulding, E.G. & T.K. Hay. 1993. Quantitative genetics of shell form of an intertidal snail: constraints on short-term response to selection. Evolution, 47: 576-592.

Carballo, M., C. García & E. Rolán-Alvarez. 2001. Heritability of shell traits in wild *Littorina saxatilis* populations: results across a breeding zone. J. Shellfish Res., 20: 415-422.

Chapman, M.G. 1995. Spatial patterns of shell shape of three species of co-existing littorinid snails in New South Wales, Australia. J. Moll. Stud., 61: 141-162.

Clavijo, C., F. Scarabino, A. Rojas & S. Martínez. 2005. Lista sistemática de los moluscos marinos y de estuarios del Cuaternario de Uruguay. Montevideo-Uruguay. Com. Soc. Malacol., 9: 381-411.

Clench, W.J. & R.D. Turner. 1964. The subfamilies Volutinae, Zidoninae, Odontocymbiolinae and Calliotectinae in the western Atlantic. Johnsonia, 4: 129-180.

Cruz, R., E. Rolán-Alvarez & C. García. 2001. Sexual selection on phenotypic traits in a hybrid zone of *Littorina saxatilis* (Olivi). J. Evol. Biol., 14: 773-785.

Daleo, P., M. Escapa, J. Alberti & O. Iribarne. 2006. Negative effects of an autogenic ecosystem engineer: interactions between coralline turf and an ephemeral green alga. Mar. Ecol. Prog. Ser., 315: 67-73.

Escofet, A.M., J.M. Orensanz, S. Olivier & V. Scarabino. 1977. Biocenología bentónica del golfo San Matías (Río Negro, Argentina): metodología, experiencias y resultados del estudio ecológico de un gran espacio geográfico en América Latina. An. Inst. Cienc. Mar Limnol., 5: 59-82.

Estebenet, A. & P. Martín. 2003. Shell interpopulation variation and its origin in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) from southwestern Buenos Aires Province, Argentina. J. Moll. Stud., 69: 301-310.

Fabiano, G., G. Riestra, O. Sanana, E. Delfino & R. Foti. 2000. Consideraciones sobre la pesquería del caracol fino *Zidona dufresnei* (Mollusca, Gastropoda) en el Uruguay. Periodo 1996-1998. In: M. Rey (ed.). Recursos pesqueros no tradicionales: moluscos bentónicos marinos. Proyecto INAPE-PNUD URU/92/003. ISBN, 9974-563-13-5, pp. 114-142.

Forcelli, D.O. 2000. Moluscos magallánicos. Guía de moluscos de Patagonia y sur de Chile. Vázquez Mazzini Editores, Buenos Aires, 200 pp.

Giménez, J. 2003. Biología reproductiva y crecimiento del caracol *Zidona dufresnei* (Donovan, 1823) Caeno-gastropoda, Volutidae de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Tesis Doctoral Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 156 pp.

Giménez, J. & P.E. Penchaszadeh. 2002. Reproductive cycle of *Zidona dufresnei* (Caenogastropoda: Volutidae) from the Southwestern Atlantic Ocean. Mar. Biol., 140: 755-761.

Giménez, J. & P.E. Penchaszadeh. 2003. Size at first sexual maturity in *Zidona dufresnei* (Caenogas-tropoda: Volutidae) of the Southwestern Atlantic Ocean (Mar del Plata, Argentina). J. Mar. Biol. Ass. UK, 83: 293-296.

Giménez, J., T. Brey, A. Mackensen & P.E. Penchaszadeh. 2004. Age, growth, and mortality of the prosobranch *Zidona dufresnei* (Donovan, 1823) in the Mar del Plata area, Southwestern Atlantic Ocean. Mar. Biol., 145: 707-712.

Giménez, J., M. Lasta, G. Bigatti & P.E. Penchaszadeh. 2005. Exploitation of the volute snail *Zidona dufresnei* in Argentine waters, Southwestern Atlantic Ocean. J. Shellfish Res., 24: 1135-1140.

Guerrero, R.A., C.A. Lasta, E.M. Acha, H.W. Mianzan & M.B. Framiñan. 1997. Atlas hidrográfico del Río de la Plata. Comisión Administradora del Río de la Plata-Instituto Nacional de Desarrollo Pesquero. Buenos Aires, Montevideo, 109 pp.

Janson, K. & P. Sundberg. 1983. Multivariate morpho-metric analysis of two varieties of *Littorina saxatilis* from the Swedish west coast. Mar. Biol., 74: 49-53.

Johannesson, B. & K. Johannesson. 1996. Population differences in behavior and morphology in the snail *Littorina saxatilis*: phenotypic plasticity or genetic differentiation. J. Zool., 240: 475-493.

Johannesson, K., B. Johannesson & E. Rolán-Alvarez. 1993. Morphological differentiation and genetic cohesiveness over a microenvironmental gradient in the marine snail *Littorina saxatalis*. Evolution, 47: 1770-1787.

Kaiser, P. 1977. Beitrage zur Kenntis der Voluten (Mollusca) in argentinisch-brasianischen Gewassern (mit der Beschreibungzweir neuer Arten) Mitt. Hamburg. Zool. Mus. Inst. Brad., 74: 11-26.

Lahille, F. 1895. Contribución al estudio de las Volutas Argentinas. Rev. Mus. Plata, 6: 293-332.

Martel, A., D.H. Larrivée, K.R. Klein & J.H. Himmelman. 1986. Reproductive cycle and seasonal feeding activity of the neogastropod *Buccinum undatum*. Mar. Biol., 92: 211-221.

Martín-Mora, E., F.C. James & A.W. Stoner. 1995. Developmental plasticity in the shell of the Queen conch *Strombus gigas*. Ecology, 76: 981-994.

Martín, P. & A. Estebenet. 2002. Spread of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* in Southern Pampas and Northern Patagonia, Argentina. J. Freshwater Ecol., 17: 331-333.

Mazio, C.A. & C.D. Vara. 1983. Las mareas del golfo San Matías., Servicio de Hidrografía Naval, Armada Argentina, Buenos Aires, Inf. Nº13: 32 pp.

Menni, R.C. & M.F.W. Stehmann. 2000. Distribution, environment and biology of batoid fishes off Argentina, Uruguay, and Brasil. A review. Rev. Museo Argent. Cienc. Nat., 2: 69-109.

Narvarte, M.A., V. Willers, M.S. Avaca & M.E. Echave. 2008. Population structure of the snail *Buccinanops globulosum* (Prosobranchia, Nasariidae) in San Matías Gulf, Patagonia Argentina: isolated enclaves? J. Sea Res., 60: 144-150.

Penchaszadeh, P.E., G. Pastorino & M.I. Brogger. 2008. Moluscos gasterópodos y bivalvos. In: D. Boltovskoy (ed.). Atlas de sensibilidad ambiental del mar y de la costa. [www.atlas.ambiente.gov.ar].

Pereyra, P., M. Narvarte & P.R. Martín. 2009. Notes on oviposition and demography of a shallow water population of the edible snail *Zidona dufresnei* (Caenogastropoda: Volutidae) living in San Antonio Bay (northern Patagonia, Argentina). J. Mar. Biol. Ass. UK, 86: 1209-1214.

Piola, A.R. & L.N. Scasso. 1988. Circulación en el golfo San Matías. Geoacta, 15: 33-51.

Riestra, G. & G. Fabiano. 2000. Moluscos gasterópodos de interés socio-económico para el Uruguay. Recursos

pesqueros no tradicionales: moluscos bentónicos marinos. Proyecto URU/92/003, pp. 75-141.

Roche, A. 2013. Historia de vida de *Zidona dufresnei* Donovan, 1823 (Mollusca: Gastropoda) en la bahía San Antonio, una especie de creciente interés comercial. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, 179 pp.

Roche, A., M. Maggioni, A. Rumi & M. Narvarte. 2013. Duration of intracapsular development of *Zidona dufresnei* in its southern distributional limit. Am. Malacol. Bull., 31: 85-89.

Scarabino, V. 1977. Moluscos del golfo San Matías (Provincia de Río Negro, República Argentina). Inventario y claves para su identificación. Com. Soc. Malacol., Montevideo, 4: 177-297.

Torroglosa, E.M. & J. Giménez. 2010. Temporal variation in size at maturity of the snail *Zidona dufresnei* from the southwestern Atlantic Ocean after ten years of fishery exploitation. Aquat. Biol., 11: 163-167.

Véliz, D., F.M. Winkler & C. Guisado. 2003. Developmental and genetic evidence for the existence of three morphologically cryptic species of *Crepidula* in northern Chile. Mar. Biol., 143: 131-142.

Received: 5 August 2014; Accepted: 10 December 2014

Williams, G. 2004. ¿Cuáles son las fuentes para mantener la productividad del golfo San Matías? Seminario Licenciatura en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de la Patagonia “San Juan Bosco”, Puerto Madryn, 100 pp.

Williams, G., D. Gagliardini, A. Rivas, M. Sapoznik, M. Narvarte & R. González. 2006. Caracterización ambiental del golfo San Matías (Argentina) mediante información AVHRR y Sea WiFs. Resumen en las VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Argentina, 55 pp.

Yamada, S.B. 1987. Geographic variation in the growth rates of *Littorina littorea* and *L. saxatilis*. Mar. Biol., 96: 529-534.

Yeap, L., R. Black & M.S. Johnson. 2001. The complexity of phenotypic plasticity in the intertidal snail *Nodilittorina australis*. Biol. J. Linn. Soc., 72: 63-76.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 457-465, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-7

Research Article

Uso de harina de cabeza de camarón como reemplazo proteico de harina de pescado en dietas balanceadas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890)

Luis Daniel Espinosa-Chaurand[1], Antonio Silva-Loera[2]
Zaúl García-Esquivel[3] & Lus Mercedes López-Acuña[2]
[1]Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), IPN 195, La Paz, BCS, 23096, México
[2]Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California
P.O. Box 453, Ensenada, BC 22860, México
[3]Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California
Ensenada, BC 22800, México
Corresponding author: Luis Daniel Espinosa-Chaurand (mcespinosachaurand@gmail.com)

RESUMEN. En dietas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (26,3 ± 4,7 g y 13,6 ± 1 cm) se evaluó la sustitución proteica parcial de harina de pescado (HP) por harinas de cabeza de camarón (HCC), sobre su crecimiento, sobrevivencia, factor de conversión alimenticia (FCA) y composición química de tejidos, y el coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca (CDA), proteínas (CDAP) y lípidos (CDAL) de estas dietas. Se utilizó HCC de cabezas enteras deshidratadas al sol (F) y HCC de cabezas maceradas y deshidratadas en secador de aire (M). Las dietas fueron isoproteicas (55,5% de proteína cruda), isolipídicas (15% de lípidos) e isoenergéticas (4,6 Kcal g^{-1}) remplazando el 0% (dieta control; DC), 15% (F15 y M15) y 30% (F30 y M30) de la proteína de la HP por la de HCC. Después de 57 días la sobrevivencia con HCC (99.44 ± 1.92%) fue mayor que DC (88,89 ± 3,85%). El peso ganado, crecimiento específico en peso (TCE) y el consumo total no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0{,}05$) entre los organismos alimentados con HCC. No obstante, la dieta M30 presentó un promedio mayor en TCE (0,99 ± 0,06) y crecimiento (19,82 ± 1.64 g/pez). La dieta M30 significativamente tuvo la mejor FCA (1,61 ± 0,13) y las más altas CDA (66,18 ± 1,28), CDAP (86,51 ± 0,53) y CDAL (72,29 ± 1,10). Se concluye que la sustitución proteica de HP por HCC en alimento para juveniles de totoabas mejoró los parámetros productivos y los CDAs, obteniéndose mejores resultados con la inclusión de HCC macerada y niveles de sustitución de 30%.

Palabras clave: *Totoaba macdonaldi*, harina de cabeza de camarón, sustitución proteica, digestibilidad, dietas de crecimiento.

Using shrimp head meal as protein replacement of fish meal in diets for juvenile of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890)

ABSTRACT. In diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles (26.3 ± 4.7g y 13.6 ± 1cm) the partial replacement of fishmeal protein (HP) with shrimp head meal (HCC) was evaluated, over their growth, survival, fed conversion (FCA) and chemical composition of tissues and the apparent digestibility coefficient of dry matter (CDA), protein (CDAP) and lipids (CDAL) of these diets. The HCC used were from the whole shrimp head sun dried (F) and smashed shrimp head dehydrated in a hot air drier. Diets were isoproteic (55.5% crude protein), isolipídic (15% lipids) and isocaloric (4.6 kcal g^{-1}) replacing 0% (control diet; DC), 15% (F15 and M15) and 30% (F30 and M30) of the HP protein by the HCC. At 57th day, survival with HCC (99.44 ± 1.92%) was higher than DC (88.89 ± 3.85 %). The gain weight, weight specific growth (TCE) and total intake were not statistically different ($P > 0.05$) between organisms feed with HCC, however with the M30 diet the TCE had higher average (0.99 ± 0.06) and growth (19.82 ± 1.64 g/fish). With diet M30 the FCA was the best significantly (1.61 ± 0.13) and the higher CDA (66.18 ± 1.28), CDAP (86.51 ± 0.53) and CDAL (72.29 ± 1.10). It concluded that replaced protein of HP by HCC in diet for juvenile totoaba improved the growth and CDAs, yielding better results with the inclusion of macerated HCC with a replacement level of 30%.

Keywords: *Totoaba macdonaldi*, shrimp head meal, replacement protein, digestibility, growth diets.

Corresponding editor: Patricio Dantagnan

INTRODUCCIÓN

La harina de pescado tiene un especial interés nutricional y económico por representar una de las fuentes principales de proteína en los alimentos para la industria pecuaria, así como uno los ingredientes de mayor costo (Civera *et al*., 2000), representando hasta el 50% de éstos (Fraga-Castro & Jaime-Ceballos, 2011). El uso de harina de pescado como alimento en acuicultura en 1980 fue del 10%, durante 2006 aumentó a 46% (Tacon *et al*., 2006). Debido a esta tendencia, Hardy (2006) propuso la búsqueda de fuentes alternas de proteína para uso en acuicultura.

Entre estas, la harina de cabeza de camarón (HCC) pueden ser una opción económicamente recomendable en alimentos formulados para especies acuáticas, ya que ofrecen atractivas ventajas como: 1) costos bajos para su obtención y transformación a harina (Shoemaker & Richards-Rajaduraí, 1991; Cira *et al*., 2002; Honorato *et al*., 2006), 2) perfil de aminoácidos comparable con la harina de soya o de pescado (Shoemaker & Richards-Rajaduraí, 1991), 3) contiene una amplia variedad de estimulantes de alimentación o quimio-atractantes (Shoemaker & Richards-Rajaduraí, 1991; Hertrampf & Piedad-Pascual, 2000), 4) fuente natural de pigmentos carotenoides y quitina (Fox *et al*., 1994), y 5) no son fuente directa de alimentos para el hombre.

La totoaba (*Totoaba macdonaldi)* es un pez endémico del Golfo de California, México, carnívoro, de hábitos nocturnos, demersal que habita desde aguas someras hasta 200 m de profundidad, usualmente cerca de la desembocadura de los ríos (Barrera *et al*., 1994). La dieta natural de los juveniles es camarón, cangrejo, jaiba y algunas especies de peces (Barrera *et al*., 1994; Cisneros-Mata *et al*., 1995). Sobre la nutrición de este organismo existen pocos trabajos, como el de Rodríguez-Gómez (2003), quien determinó en juveniles de totoaba la composición proximal y contenido de ácidos grasos; la investigación de Solórzano-Salazar (2006) que observó el efecto de los niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de los organismos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de la sustitución proteica de HCC por harina de pescado en alimento formulado para juveniles de *T. macdonaldi* sobre su crecimiento, sobrevivencia, factor de conversión alimenticia (FCA) y composición química de tejidos, así como sobre el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) de materia seca, proteínas (CDAP) y lípidos (CDAL) de estas dietas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicada en Ensenada, Baja California, México (31°51´51.51”N, 116°39´59.39”W). Las HCC utilizadas provinieron de cabezas de camarón deshidratadas al sol directamente (F) y de cabezas de camarón maceradas y deshidratadas con aire caliente a 80°C (M) en un secador de flujo de aire. Las HCC maceradas se obtuvieron macerando las cabezas de camarón (CC) frescas en un molino manual, recuperando y homogenizando la mezcla de todo el material molido directamente en las charolas de deshidratación, para evitar la pérdida de nutrientes por escurrimientos. Una vez deshidratadas las CC frescas y maceradas se molieron con un molino de martillo y tamizaron a 100 µ, la humedad final de las HCC F y M fue de 9,8 y 8,5%, respectivamente.

A partir de estas HCC, se formularon y prepararon cinco dietas isoproteicas (55,5% de proteína cruda, PC), isolipídicas (15% de lípidos totales, LT) e isoenergéticas (4,6 Kcal g^{-1}) utilizando el porcentaje de inclusión de la HCC como variable, en estas dietas se remplazó el 0% (dieta control; DC), 15% (F15 y M15) y 30% (F30 y M30) de la proteína de la harina de pescado (HP) por la proteína de la HCC (Tabla 1). En la dieta control (DC) se usó exclusivamente harina de pescado como fuente de proteína. El aceite de pescado y el almidón fueron utilizados como fuentes de lípidos y carbohidratos, respectivamente. Para la elaboración de las dietas experimentales todos los ingredientes fueron mezclados en un procesador de alimentos (Hobart, Troy, OH) durante 10 a 15 min, hasta producir una masa homogénea, que se pasó por un extrusor de 5 mm de diámetro para su peletizado. Los pellet se secaron durante 8 h a 65°C en un horno de convección, luego se conservaron en bolsas herméticas de plástico (ziplock ®) a -4°C hasta su uso.

Se utilizaron 225 juveniles de *T. macdonaldi* de 185 días de edad (26,3 ± 4,7 g de peso total y 13,6 ± 1 cm de longitud total) distribuidos aleatoriamente en 15 unidades experimentales (UE) de 65 L (15 org/UE). Todas las UE se mantuvieron con aguas claras en un sistema semicerrado, con filtro biológico integrado con flujo de 1,5 L min^{-1}, y bajo condiciones controladas de fotoperiodo (12:12 h; luz:oscuridad), temperatura (20,5 ± 0,9°C) y agua de mar de 33 de salinidad.

Los diferentes tratamientos se distribuyeron por triplicado en un diseño completamente al azar. Para evitar el efecto por cambio de alimento, antes de iniciar el experimento se acondicionó los peces a las dietas experimentales substituyendo parcialmente la dieta base hasta el 100% de la experimental en un lapso de siete días. Durante 57 días del experimento los organismos fueron alimentados dos veces al día (09:00 y 18:00 h) con el 5% de sus peso vivo para asegurar la

Tabla 1. Ingredientes y composición proximal de las dietas formuladas (g kg^{-1} de peso seco) utilizadas en la alimentación de juveniles de *Totoaba macdonaldi* por 57 días.

Ingrediente (g kg^{-1})	Tratamiento				
	DC	M15	M30	F15	F30
Harina de pescado[a]	648,5	551,2	454,0	551,2	454,0
Harina de soya[b]	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
HCC macerada[c]		132,3	264,5		
HCC fresca[d]				120,6	241,0
Aceite de pescado	49,8	34,7	19,6	40,7	31,6
Celulosa	79,6	61,5	43,3	67,5	55,4
Gelatina	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Almidón	11,0	9,2	7,5	8,9	6,9
Premezcla mineral[e]	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Premezcla de vitaminas[f]	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Benzoato de Na	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Butilhidroxitolueno α-tocoferol	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Composición proximal real (%)					
Proteína cruda (N x 6,25)	55,88 ± 1,24[z]	55,64 ± 0,23[z]	55,41 ± 0,02[z]	55,84 ± 1,82[z]	55,82 ± 0,61[z]
Lípidos totales	15,24 ± 0,60[z]	15,11 ± 0,66[z]	15,35 ± 0,24[z]	15,60 ± 0,46[z]	15,09 ± 1,04[z]
Cenizas	13,32 ± 0,02[z]	13,41 ± 0,19[z]	13,85 ± 0,06[z]	13,45 ± 0,04[z]	13,65 ± 0,19[z]
ELN + fibra cruda[g NA]	15,56	15,85	15,39	15,11	15,44
Energía (Kcal g^{-1})[NA]	4,60	4,60	4,60	4,60	4,60
PD:ED (g $Mcal^{-1}$)[h NA]	1,19	1,19	1,19	1,19	1,19

Los superíndices diferentes en cada fila muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). [NA] No se analizó estadísticamente.
[a] Harina de pescado entero (68,9% proteína, 14,1% lípidos, 14,0% cenizas, 5,2 Kcal g^{-1}).
[b] Harina de soya (53,5% proteína, 9,0% lípidos, 17,9% cenizas, 4,42 Kcal g^{-1}).
[c] Harina de cabeza de camarón macerada deshidratada en secador (50,7% proteína, 21,8% lípidos, 19,0% cenizas, 4,94 Kcal g^{-1}).
[d] Harina de cabeza de camarón fresca deshidratada al sol (55,7% proteína, 18,9% lípidos, 17,2% cenizas, 4,97 Kcal g^{-1}).
[e] g/kg premezcla mineral: KH_2PO_4, 320; NaH_2PO_4, 250; $Ca(H_2PO_4)_2$, 200; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 150; lactato de calcio, 35; Citrato férrico, 25; NaCl, 10; $ZnSO_4$ $7H_2O$, 3,53; $MnSO_4 . H_2O$, 1,62; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,31; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,01; silicona cristalina, 17.0.
[f] g/kg premezcla de vitaminas: inositol, 256,39; cloruro de colina, 149,78; niacina, 51,28; rivoflavina; ácido ρ-amino benzoico, 25,53; ácido pantoténico, 17,92; β-caroteno, 9,39; menadiona, 6,11; tiamina-HCl, 3,85; piridoxina, 3,06; ácido fólico, 0,96; biotina, 0,39; colecalciferol, 25793 UI; α-tocoferol, 25643 UI; vitamina B_{12}, 5,59 mg.
[g] Extracto libre de nitrógeno (ELN) + fibra cruda = 100 – (% proteína cruda + % lípidos totales + % cenizas).
[h] Proteína digestible : energía digestible (PD : ED).

saciedad. Las UE se sifonearon 20 min después de la alimentación para eliminar los residuos de alimento y heces.

Los parámetros de crecimiento se calcularon a partir de dos biometrías, se pesaron (g) todos los organismos al inicio y final del bioensayo. Un día antes de las mediciones no se alimentó a los organismos. Para la determinación de la sobrevivencia se registraron diariamente los organismos muertos. El consumo total de alimento (CT) se calculó del día 9 al 28 y del 41 al 49 del bioensayo. Los parámetros se determinaron de acuerdo a: sobrevivencia (%) = 100 ─ (org.inicio ─ org.final/org.inicio) * 100; crecimiento (g/pez) = peso final ─ peso inicial; tasa de crecimiento específico en peso (TCE) = [(ln peso final ─ ln peso inicial)/días bioensayo] * 100; consumo total de alimento (CT; g/pez) = (alimento administrado ─ alimento no consumido)/organismos en UE; factor de conversión alimenticia (FCA) = alimento consumido/incremento en peso; tasa de eficiencia de la proteína (TEP) = incremento en peso/proteína consumida; índice hepatosomático (IHS) = peso del hígado/peso del pez.

Durante los días 32 a 39 y del 51 a 55 del bioensayo se determinó el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA), mediante la recolección de las heces por aspirado (sifón) en el transcurso de los 20 min posteriores a la ingesta de alimento. Las heces fueron pesadas y conservadas a -20°C para su análisis posterior. Las CDA fueron calculadas de acuerdo a Lovell (1998) con las siguientes expresiones: CDA de materia seca (CDAM) = [100 ─ (cenizas en alimento/cenizas en heces)] * 100; CDA de proteína

(CDAP) = [100 − ((cenizas en alimento/cenizas en heces) * (proteína en heces/proteína en alimento))] * 100; CDA de lípidos (CDAL) = [100 − ((cenizas en alimento/ cenizas en heces) * (lípidos en heces/lípidos en alimento))] * 100.

Para conocer la variación de la composición proximal en el hígado, músculo del pez (sin huesos, espinas u otras estructuras) y pez entero (incluye escamas, huesos, espinas y todas sus estructuras) se sacrificaron al inicio del experimento 10 peces y al final 5 por cada UE. Los peces enteros, músculos e hígados disectados fueron pesados y conservados a -20°C para su análisis proximal posterior. El peso seco promedio de las muestras de pez entero, músculo e hígado de cada tratamiento fue obtenido después de liofilizado por 48 h. El contenido de nitrógeno total de las muestras de alimento, heces y peces se calculó siguiendo el método micro-Kjeldhal (AOAC, 1995) aplicando el factor de 6,25 para obtener el porcentaje de proteína cruda. Los lípidos totales se determinaron de acuerdo a Folch *et al.* (1957). Las cenizas totales se obtuvieron incinerando las muestras a 500°C por 8 h. El extracto libre de nitrógeno (ELN), más la fibra cruda fueron calculados por la diferencia entre 100 y la suma de las fracciones correspondientes a la proteína cruda, lípidos totales y cenizas (Jobling, 1994). Las cenizas insolubles en ácido de las heces y las dietas se determinaron según lo descrito por Montaño-Vargas *et al.* (2002), modificado por Tejada (1992).

A los datos generados de sobrevivencia, crecimiento, TCE, CT, FCA, TEP, IHS, CDA, CDAP, CDAL y nutrientes se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada caso, previas pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, α = 0,05) y homocedasticidad (Bartlett, α = 0,05). A los datos expresados en porcentaje (sobrevivencia y composición química) se aplicó la transformación del arcoseno de su raíz cuadrada (Zar, 1999). Las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos se determinaron por el método de comparaciones múltiples de Tukey (P < 0,05). Todas las pruebas se realizaron mediante el software estadístico SigmaStat V3.1 (2004).

RESULTADOS

Los resultados de sobrevivencia, crecimiento, TCE, CT, FCA, TEP y IHS en los juveniles de totoaba, así como los CDAs de las dietas experi-mentales se presentan en la Tabla 2. La sobrevivencia de los tratamientos con HCC (99,44 ± 1,92%) fue significativamente (P < 0,05) mayor que la del tratamiento control (88,89 ± 3,85%), sin presentar diferencias estadísticas (P > 0,05) entre ellos. El peso ganado y la TCE no presentaron diferencias significativas (P > 0,05) entre los organismos alimentados con dietas que contenían HCC, no obstante la dieta M30 presentó un mayor crecimiento medio (19,82 ± 1,64 g/pez) y la TCE (0,99 ± 0,06) respecto a los otros tratamientos que contenían HCC. Los organismos alimentados con DC tuvieron un crecimiento significativamente menor (P < 0,05; TCE = 0,26 ± 0,14) que los organismos alimentados con dietas que contenían HCC.

No existió diferencia estadística (P > 0,05) en el CT entre los tratamientos que contenían HCC, pero todos fueron significativamente superiores (P < 0,05) al valor de CT en los organismos del tratamiento control. Los peces alimentados con las dietas M15 y M30 tuvieron los FCA significativamente (P < 0,05) más eficientes que el resto de las dietas (1,60 ± 0,10 y 1,61 ± 0,13, respectivamente), mientras que los valores de la TEP que fueron significativamente (P < 0,05) mayores se presentaron en animales alimentados con las dietas M15 (1,13 ± 0,07), M30 (1,12 ± 0,09) y F15 (0,91 ± 0,14). El IHS de los juveniles de totoaba no presentó diferencias estadísticas (P > 0,05) entre los tratamientos, con un promedio general de 1,29 ± 0,10.

El CDA, CDAP y CDAL fueron estadísticamente menores (P < 0,05) en los peces alimentados con DC (44,28 ± 4,58; 74,12 ± 1,95 y 58,51 ± 2,79, respectivamente) que en los alimentados con dietas con HCC. Los valores significativamente (P < 0,05) mayores del CDA, CDAP y CDAL los presentaron los organismos alimentados con la dieta M30 (66,18 ± 1,28, 86,51 ± 0,53 y 72,29 ± 1,10, respectivamente), respecto al resto de las formulaciones.

Los valores iniciales y valores finales por tratamiento de la composición proximal del hígado, músculo del pez (sin huesos, espinas u estructuras) y pez entero (incluye escamas, huesos, espinas y todas sus estructuras) se encuentran en la Tabla 3. La composición proximal inicial del pez entero, músculo del pez e hígado de los juveniles de totoabas fueron significativamente diferentes a su composición final (P < 0,05), aumentando el contenido de humedad, cenizas y proteínas y disminuyendo en el valor de lípidos y el ELN+fibra.

La composición proteínica en las totoabas completas no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos (P > 0,05), mientras que las concentraciones estadísticamente superiores (P < 0,05) de cenizas fueron con M15 (19,69 ± 0,22%) y de lípidos correspondieron a los tratamientos que contenían HCC maceradas en su formulación (M15 con 9,26 ± 0,47% y M30 con 8,91 ± 0,85%). El porcentaje promedio de proteína cruda presente en el músculo de los juveniles de totoaba fue de 84,49 ± 1,80%, donde las diferencias estadísticas entre los tratamientos se expresaron apenas en pocas unidades porcentuales entre ellos, presentando

Tabla 2. Sobrevivencia, tasa de crecimiento específica, consumo de alimento, factor de conversión alimenticia y tasa de eficiencia proteica (TEP) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* después de 57 días y coeficientes de digestibilidad aparente del alimento, proteína y lípidos de las dietas experimentales.

Parámetro	Dieta				
	DC	M15	M30	F15	F30
Sobrevivencia (%)	88,89 ± 3,85[a]	97,78 ± 3,85[b]	100 ± 0,00[b]	100 ± 0,00[b]	100 ± 0,00[b]
Peso inicial (g pez^{-1})	26,50 ± 0,42[a]	26,25 ± 0,41[a]	26,20 ± 0,16[a]	26,18 ± 0,10[a]	26,26 ± 0,30[a]
Peso final (g pez^{-1})	30,81 ± 2,92[a]	42,86 ± 2,27[b]	46,02 ± 1,74[b]	40,14 ± 2,50[b]	40,24 ± 3,65[b]
Crecimiento (g pez^{-1})	4,32 ± 2,58[a]	16,60 ± 1,86[b]	19,82 ± 1,64[b]	13,96 ± 2,59[b]	13,98 ± 3,55[b]
TCE	0,26 ±0,14[a]	0,86 ± 0,06[b]	0,99 ± 0,06[b]	0,75 ± 0,12[b]	0,74 ± 0,16[b]
CT (g pez^{-1})	14,85 ± 2,71[a]	26,54 ± 2,33[b]	31,83 ± 1,81[b]	27,41 ± 0,86[b]	28,96 ± 3,30[b]
FCA	4,21 ± 2,10[b]	1,60 ± 0,10[a]	1,61 ± 0,13[a]	2,00 ± 0,32[b]	2,14 ± 0,38[b]
TEP	0,50 ± 0,22[a]	1,13 ± 0,07[b]	1,12 ± 0,09[b]	0,91 ± 0,14[b]	0,86 ± 0,14[ab]
IHS	1,31 ± 0,03[a]	1,27 ± 0,06[a]	1,37 ± 0,18[a]	1,26 ± 0,04[a]	1,23 ± 0,11[a]
Digestibilidad (CDA, %)					
CDA	44,28 ± 4,58[a]	63,75 ± 1,66[bc]	66,18 ± 1,28[c]	64,90 ± 0,31 [c]	58,48 ± 1,43[b]
CDAP	74,12 ± 1,95[a]	84,30 ± 0,69[c]	86,51 ± 0,53[d]	83,52 ± 0,54[bc]	83,09 ± 0,56[b]
CDAL	58,51 ± 2,79[a]	67,22 ± 1,99[b]	72,29 ± 1,10[c]	65,11 ± 0,89[b]	60,46 ± 1,97[a]

Tasa de crecimiento específico (TCE): (ln (peso final) - ln (peso inicial) / piempo del experimento) X 100.
Consumo total de alimento (CT): alimento total consumido (g) / número de organismos durante 57 días.
Factor de conversión alimenticia (FCA): alimento consumido (g) / incremento de peso húmedo.
Tasa de eficiencia de proteína (TEP): incremento en peso húmedo (g) /proteína consumida (g).
Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA): 100 - (g de cenizas en la dieta / g de cenizas en las heces) X 100.
CDA de la proteína (CDAP): 100 - [(cenizas en la dieta / cenizas en las heces) X (proteína en las heces / proteína en la dieta)] X 100.
CDA de los lípidos (CDAL): 100 - [(cenizas en la dieta / cenizas en las heces) X (lípidos en las heces / lípidos en la dieta)] X 100.
Los datos son en base a los grupos de dietas por triplicado; Los superíndices diferentes de las medias (±D.E.) por renglón muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

el valor más alto ($P < 0,05$) el tratamiento DC (86,63 ± 0,14%). Los valores significativamente ($P < 0,05$) mayores en cenizas en el músculo lo presentaron aquellos alimentados con HCC, mientras que las concen-traciones lipídicas mayores ($P < 0,05$) fueron en los juveniles alimentados con las dietas M15 (4,95 ± 0,41%), M30 (4,97 ± 0,83%) y F15 (4,69 ± 0,37%). Para el caso del hígado de los organismos bajo los diferentes tratamientos, la mayor concentración de la proteína cruda se determinó en los peces alimentados con las dietas M15 (59,48 ± 0,52%) y DC (59,49 ± 0,52%), en tanto los porcentajes significativamente ($P < 0,05$) mayores de cenizas correspondieron a los peces alimentados con M15 (5,88 ± 0,02 %), M30 (5,81 ± 0,10%) y F30 (5,93 ± 0,01%). El contenido lipídico promedio del hígado de estos peces fue de 17,98 ± 1,37%, sin diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

La sobrevivencia en los juveniles de totoaba se presentó en menor medida en los organismos alimentados con DC, con este tratamiento los ejemplares fueron más pequeños y delgados respecto a los peces de los tratamientos que incluían HCC, lo cual coincide con lo mencionado por Storebakken & Austreng (1987), que mencionan que en *Salmo salar* los grupos de organismos más pequeños, producto de un bajo consumo de alimento y baja ganancia de peso, presentaron una mayor mortalidad.

La causa de la variación del CT entre la DC y las dietas con HCC (M15, M30, F15 y F30) se explicaría por la preferencia alimenticia y la ingesta, que en los organismos acuáticos constituye un proceso selectivo gobernado por un mecanismo complejo de interacción producida entre la composición química del alimento y la quimiosensibilidad del espécimen a ciertos compo-nentes del alimento (Ramos *et al.*, 2001), siendo que la quimiosensibilidad es un importante mecanismo en la regulación de la búsqueda de alimento (Harpaz *et al.*, 1987), que minimiza el tiempo de búsqueda y maximiza la proporción neta de energía o nutrientes ingeridos (Mendoza *et al.*, 1996). Por lo cual, posible-mente los alimentos que contienen HCC presentan un mayor CT al considerar que parte de la alimentación de los juveniles de totoaba en su ambiente natural comprende al camarón, cangrejo y jaiba (Ruíz, 1980; Barrera *et al.*, 1994; Cisneros-Mata *et al.*, 1995). En experimentos de laboratorio, se ha señalado que la incor-

Tabla 3. Composición proximal del hígado, músculo del pez (sin huesos, espinas u otras estructuras) y pez entero (incluye escamas, huesos, espinas y todas sus estructuras) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas experimentales durante 57 días.

Composición proximal (%)	Inicial	Dieta				
		DC	M15	M30	F15	F30
			Hígado			
Humedad [NA]	68,09	78,72	78,37	77,25	76,76	77,35
Cenizas	2,93 ± 0,07[a]	5,63 ± 0,22[bc]	5,88 ± 0,02[c]	5,81 ± 0,10[c]	5,26 ± 0,08[b]	5,93 ± 0,01[c]
Proteína	31,98 ± 0,68[a]	59,49 ± 0,52[c]	59,48 ± 0,52[c]	55,28 ± 0,64[b]	54,75 ± 0,61[b]	53,05 ± 0,94[b]
Lípidos	35,82 ± 0,46[b]	17,04 ± 0,59[a]	16,95 ± 0,00[a]	19,44 ± 0,01[a]	19,51 ± 2,46[a]	16,94 ± 0,07[a]
ELN+Fibra [NA]	29,27	17,84	17,68	19,47	20,48	24,08
			Músculo del pez			
Humedad [NA]	70,25	79,82	79,76	79,27	79,52	79,40
Cenizas	4,28 ± 0,1[a]	5,26 ± 0,20[b]	6,61 ± 0,03[c]	6,20 ± 0,08[c]	6,57 ± 0,33[c]	6,44 ± 0,17[c]
Proteína	74,70 ± 0,60[a]	86,63 ± 0,14[e]	83,66 ± 0,87[bc]	82,01 ± 0,20[b]	85,74 ± 0,31[de]	84,43 ± 0,33[cd]
Lípidos	5,39 ± 0,71[bc]	3,68 ± 0,39[a]	4,95 ± 0,41[ab]	4,97 ± 0,83[ab]	4,69 ± 0,37[ab]	3,54 ± 0,08[a]
ELN+Fibra [NA]	15,63	4,43	4,78	6,82	3,00	5,60
			Pez entero			
Humedad [NA]	73,85	75,42	77,57	77,33	78,23	77,43
Cenizas	16,41 ± 0,28[a]	18,16 ± 0,04[b]	19,69 ± 0,22[c]	17,85 ± 0,13[b]	18,07 ± 0,09[b]	18,50 ± 0,36[b]
Proteína	65,28 ± 0,31[a]	69,25 ± 0,49[b]	68,30 ± 0,14[b]	68,72 ± 0,70[b]	67,86 ± 0,77[b]	68,31 ± 0,50[b]
Lípidos	10,25 ± 0,16[c]	8,07 ± 0,00[ab]	9,26 ± 0,47[bc]	8,91 ± 0,85[bc]	7,17 ± 0,13[a]	8,56 ± 0,00[b]
ELN+Fibra [NA]	8,06	4,52	2,74	4,52	6,91	4,63

Los datos son en base a los grupos de dietas por triplicado. Los superíndices diferentes de las medias (±D.E.) por renglón muestran diferencias significativas ($P < 0,05$). [NA] No se analizó estadísticamente.

poración de harina de crustáceos en dietas mejora la atractabilidad debido a los quimioatractantes que contienen (Campabadal & Celis, 1996), como lo mencionan Torres-Cobian (2005) y Olsen *et al.* (2006) en *Atractoscion nobilis* y *S. salar* respectivamente, donde los quimioatractantes mejoraron el consumo y favorecieron el crecimiento. En juveniles de *Totoaba macdonaldi* se ha reportado que niveles altos de lípidos (~18%) disminuyen el consumo de alimento, lo cual se refleja en una disminución de la TCE sin afectar su TEP (Rueda-López *et al*., 2011), lo cual pudo haber pasado con el tratamiento DC en la presente investigación, unido a la falta de algún quimoatractante dentro de su formulación.

El mayor crecimiento en peso y TCE se dio en los peces alimentados con dietas que contenían HCC, en particular con la dieta M30, posiblemente por su mayor consumo y mayor eficiencia alimenticia (mejores valores de FCA, TEP, CDA, CDAP y CDAL). El mayor consumo puede ser a causa del aumento de la palatabilidad de las dietas con HCC, esto al ser el camarón un componente básico en las dietas naturales de las totoabas juveniles. Mientras que, la mejor eficiencia de la dieta M30 se explicaría a causa del macerado de las cabezas de camarón, con lo que posiblemente se promovió la liberación de las enzimas digestivas del hepatopáncreas que favorecieron la predigestión de moléculas con valor nutritivo (Cruz, 1996; Eun-Sil *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2001; Gamboa-Delgado *et al.*, 2003), dejándolas más asimilables para los peces. Brett & Groves (1979) mencionan que entre los factores del alimento que inciden en el mejoramiento de los parámetros productivos se ha reportado el valor biológico del alimento. Además, varios investigadores en diversos estudios de peces marinos sostienen que al aumentar el consumo de alimento de los organismos se aumenta la TCE (Cui & Wootton, 1988; Xiao-Jun & Ruyung, 1992; Torres-Cobián, 2005).

Solórzano-Salazar (2006) coincide con la presente investigación al reportar que en juveniles de totoaba observó un mayor crecimiento y TCE ante un mayor consumo de alimento por los organismos. Los mejores resultados con M15 y M30 en el FCA se explican por la relación existente entre los valores del consumo de alimento y el incremento en peso de los peces. Resultados similares se obtuvo en estudios de juveniles de *Labeo rohita* y de *Sparus aurata*, donde el FCA bajo correspondió al crecimiento mayor (Satpathy *et al.*, 2003; Lupatsch *et al.*, 2001). Sin embargo, Minjarez-Osorio *et al.* (2012) encontraron en dietas para juveniles de totoaba, que contenían de 47 a 55% de PC,

mejores ganancias de peso (2,1-2,3 g/pez/día) y TCE (1,7-1,8) con un FCA (2,2-2,3) mayor al reportado en la presente investigación.

El tamaño del hígado está asociado con la cantidad de nutrientes en el alimento y el balance entre ellos (Storebakken & Austreng, 1987), reportándose que un IHS entre 1,8 y 2,8 representa hígados sanos (Craig *et al.*, 1999). En este trabajo el IHS se encontró bajo estos valores, aunque los organismos se encontraron saludables, pudiendo deberse a que no hubo acumulación de lípidos en los peces, pero si un mayor crecimiento y desarrollo, considerándolos como organismos magros.

Con la dieta M30 se presentaron valores de CDA, CDAP y CDAL mayores, posiblemente debido a que el consumo de alimento fue mayor y se tuvo un adecuado paso a través del sistema digestivo del pez permitiendo una mejor asimilación de los nutrientes, así mismo, por la predisposición de la HCC macerada para su asimilación, manifestándose en los mayores crecimientos, FCA y TEP. Resultados opuestos se han reportado en *Salmo trutta* y *A. nobilis*, donde a mayor consumo disminuye la digestibilidad del alimento (Jobling, 1994; Torres-Cobián, 2005), debido posiblemente a que en estos organismos entre mayor es la cantidad de alimento consumido los movimientos peristálticos aumentan y por lo tanto, inducen un aumento del paso del alimento a través el intestino (NRC, 1993). De Silva *et al.* (1995) consideran que la digestibilidad de los ingredientes que componen una dieta son los principales factores que afectan el crecimiento en los peces, por lo cual los CDA pueden indicar la calidad de los ingredientes de las dietas experimentales (Torres-Cobián, 2005). Con ello se puede inferir, mediante los valores obtenidos por M30, que la HCC macerada es un ingrediente altamente recomendado como complemento proteico en las dietas de peces marinos.

El incremento en los niveles de proteína, humedad y cenizas en el hígado, músculo y pez entero en el transcurso del tiempo, se pueden deber al crecimiento de las estructuras de los organismos (músculo, espinas, otros tejidos), mientras que la aparente disminución de lípidos y ELN+fibra se podría relacionar con una baja acumulación de energía debido a la etapa de crecimiento de las totoabas. Lovell (1998) menciona que los niveles de proteína y energía de las dietas ayudan al crecimiento y composición del cuerpo del pez, mientras que McGoogan & Gatlin (1999) afirman que con altos niveles de proteína de calidad, generalmente el resultado es un rápido crecimiento, especialmente en peces carnívoros. Así mismo, se menciona que los niveles de cenizas y proteínas en los organismos son determinados por el tamaño de los peces (Shearer, 1994), y estos tienden a acumular mayores cantidades de grasa conforme crecen, de manera que el porcentaje de lípidos del cuerpo usualmente es mayor en peces grandes que en peces pequeños de crecimiento rápido (Jobling, 1994).

Aspectos nutricionales y la composición proximal de la totoaba, señalada por Rodríguez (2003), López *et al.* (2006) y Solórzano-Salazar (2006), mencionan niveles muy similares a los encontrados en el presente estudio para los niveles de nutrientes de las diferentes partes de estos peces. De igual manera, los resultados obtenidos en el presente estudio sobre los niveles proximales concuerdan con los obtenidos en especies silvestres de la familia Sciaenidae como en *C. nobilis*, *C. nothus* (Castro-González *et al.*, 1998) y *S. aurata* (Grigorakis *et al.*, 2003).

Por todo lo anterior, se puede concluir que la sustitución proteica de harina de pescado por HCC para juveniles de totoabas es factible y mejora los parámetros productivos (crecimiento, TCE, CT, TCA y TEP) y los CDAs (CDA, CDAP y CDAL), obteniéndose mejores resultados con la inclusión de HCC macerada y niveles de sustitución de 30%. Es necesario realizar más investigaciones que contribuyan a la determinación más exacta de los niveles de sustitución proteica de estas harinas de subproductos por las harinas de pescado, las etapas de los peces donde podrían utilizarse más eficientemente, así como cuestiones biotecnológicas de estas harinas para hacerlas recomendables bio-económicamente para ésta u otras especies de peces carnívoros de importancia acuícola.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal de la granja camaronícola acuícola Vizsomar por el importante e invaluable apoyo brindado a la presente investigación durante el trabajo de campo, y a todas las personas involucradas en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, que participaron en este proyecto.

REFERENCIAS

Association of Oficial Analytical Chemist (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist. Washington DC., 1018 pp.

Barrera, G.J.C., R.M. Román & G.H. Licón. 1994. Desarrollo de la biotecnología para el cultivo de la Totoaba. Secretaría de Pesca, Subsecretaría de Fomento y Desarrollo Pesqueros, Dirección General de Acuacultura, México, 90 pp.

Brett, J.R. & T.D.D. Groves. 1979. Physiological energetic. In: W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett (eds.). Fish physiology. Vol. 8 Bioenergetics and growth. Academic Press, London, pp. 280-352.

Campabadal, C. & A. Celis. 1996. Factores que afectan la calidad de los alimentos acuícolas. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie & R. Mendoza-Alfaro (eds.). Avances en nutrición acuícola III. Monterrey, Nuevo Léon, pp. 523-540.

Castro-González, M.A., J.L. Silencio-Barrita, M.E. Juárez-Silva, S. Montaño-Benavides & R.F. Pérez-Gil. 1998. Composición química de la fauna acompañante del camarón de Veracruz (Golfo de México). Rev. Biol. Trop., 46(2): 249-256.

Cira, L.A., S. Huerta & K. Shirai. 2002. Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus* sp.) en un reactor de fermentación sólida. Rev. Mex. Ing. Quim., 1(1-2): 45-48.

Cisneros-Mata, M., G. Montemayor-López & R. Román-Rodríguez. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. Conserv. Biol., 9(4): 806-814.

Civera, R., E. Goytortúa, S. Rocha, H. Nolasco, F. Vega-Villasante, E. Balart, E. Amador, G. Ponce, G. Colado, J. Lucero, C. Rodríguez, J. Solano, A. Flores-Tom, J. Monroy & G. Coral. 2000. Uso de la langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en la nutrición de organismos acuáticos. In: R. Civera-Cerecedo, C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie & L.E. Cruz-Suárez (eds.). Avances en nutrición acuícola IV. La Paz, B.C.S., pp. 349-365.

Craig, S.R., B.S. Washburn & D.M. Gatlin III. 1999. Effects of dietary lipids on body composition and liver function in juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Physiol. Biochem., 21(3): 249-255.

Cruz, S.L.E. 1996. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie & R. Mendoza-Alfaro (eds.). Avances en nutrición acuícola III. Monterrey, Nuevo Léon, pp. 207-232.

Cui, Y. & R.J. Wootton. 1988. Bioenergetics of growth of cyprinid, *Phoxinus phoxinus* (L.): the effect of ration and temperature on growth rate efficiency. J. Fish Biol., 33(5): 763-773.

De Silva, S.S. 1995. Fish nutrition in aquaculture. Chapman and Hall, London, 319 pp.

Eun-Sil, O., K. Doo-Sang, K. Jae-Ho & K. Hyeung-Rak. 2000. Enzymatic properties of a protease from the hepatopancreas of shrimp, *Penaeus orientalis*. J. Food Biochem., 24: 251-264.

Figueiredo, M.S.R.B., J.A. Kricker & A.J. Anderson. 2001. Digestive enzyme activities in the alimentary tract of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). J. Crustacean Biol., 21(2): 335-344.

Folch, J., M. Lees & G.H.S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509.

Fox, C.J., P. Blow, J.H. Brown & I. Watson. 1994. The effect of various processing methods on the physical and biochemical properties of shrimp head meals and their utilization by juvenile *Penaeus monodon* Fab. Aquaculture, 122: 209-226.

Fraga-Castro, I. & B. Jaime-Ceballos. 2011. Efecto de ensilados de pescado hígado de tiburón en el crecimiento de *Litopenaeus schmitti*, en sustitución de la harina y el aceite de pescado. Redvet, 12(11): 1-15.

Gamboa-Delgado, J., C. Molina-Poveda & C. Cahu. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boon, 1931) as a function of body weith. Aquacult. Res., 34: 1402-1411.

Grigorakis, K., K.D.A. Taylor & M.N. Alexis. 2003. Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and culture gilthead seabream (*Sparus aurata*): sensory differences and possible chemical basis. Aquaculture, 225: 109-119.

Hardy, R.W. 2006. Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for aquaculture. In: R. Civera-Cerecedo, C.J. Pérez-Estrada, L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M.G. Nieto-López, M. Tapia-Salazar, D. Real-Cavazos, A.C. Puello-Cruz & A. García-Ortega (eds.). Avances en nutrición acuícola VIII. Mazatlán, Sinaloa, pp. 410-419.

Harpaz, S., D. Kahan, R. Galun & I. Moore. 1987. Responses of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to chemical attractants. J. Chem. Ecol., 13(9): 1957-1965.

Hertrampf, J.W. & F. Piedad-Pascual. 2000. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academia Publishers, Netherlands, pp. 365-371.

Honorato, G.C., E.L. Olveira, L.S. de S. Alsina & M.M.A. Magalhaes. 2006. Estudio del proceso cinético del secado de cefalotórax de camarón. Inf. Tecnol., 16(4): 3-10.

Jobling, M. 1994. Fish bioenergetics. Chapman and Hall, London, 309 pp.

López, L.M., E. Durazo, A. Rodríguez-Gómez, C.D. True & M.T. Viana. 2006. Composición proximal y perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi.* Cienc. Mar., 32(2): 303-309.

Lovell, R.T. 1998. Nutrition and feeding of fish. Kluwer Academic Publishers, New York, 267 pp.

Lupatsch, G., W.M. Kissil, D. Salan & E. Pfeffer. 2001. Effects of varying dietary protein and energy supli on growth, body composition and protein utilization in

gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Aquacult. Nutr., 7(2): 71-80.

McGoogan, B.B. & D.M. Gatlin III. 1999. Dietary manipulations effecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops acellatus*. I. Effects of dietary protein and energy levels. Aquaculture, 178: 333-348.

Mendoza, R., J. Montemayor, J. Verde & C. Aguilera. 1996. Quimioatracción en crustáceos: papel de moléculas homólogas. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie & R. Mendoza-Alfaro (eds.). Avances en nutrición Acuícola III. Monterrey, Nuevo León, pp. 365-401.

Minjarez-Osorio, C., M.L. González-Félix & M. Pérez-Velázquez. 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in respose to dietary protein level. Aquaculture, 362-363: 50-54.

Montaño-Vargas, J., A. Shimada, C. Vásquez & M.T. Viana. 2002. Methods of measuring feed digestibility in green abalone (*Haliotis fulgens*). Aquaculture, 213: 339-346.

National Research Council (NRC). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington D.C., 114 pp.

Olsen, R.E., J. Suontama, E. Langmyhr, H. Mundheim, E. Ringo, W. Melle, M.K. Malde & G.I. Hmre. 2006. The replacement of fish meal with Antarctic krill, *Euphausia superba* in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquacult. Nutr., 12: 280-290.

Ramos, D.R., V.I. Miranda & S.C. Molina. 2001. Consumo y digestibilidad aparente de tres ingredientes marinos locales incorporados en dietas prácticas para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). Estud. Oceanol., 20: 43-50.

Rodríguez-Gómez, M.A. 2003. Composición proximal y contenido de ácidos grasos en juveniles de *Totoaba macdonaldi* del alto golfo de California. Tesis de Licenciatura Oceanología, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, 39 pp.

Rueda-López, S., J.P. Lazo, G. Correa-Reyes & M.T. Viana. 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. Aquaculture, 319(3): 385-390.

Received: 25 January 2014; Accepted: 11 December 2014

Ruiz, D.M. 1980. Recursos pesqueros de las costas de México. Editorial Limusa, México, pp. 201-204.

Satpathy, B.B., D. Mukherjee & A.K. Ray. 2003. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed conversión and body composition in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. Aquacult. Nutr., 9(1): 17-24.

Shearer, K.D. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. Aquaculture, 119: 63-88.

Shoemaker, R. & N. Richards-Rajaduraí. 1991. Shrimp waste utilizacion. Infofish Technical Handbook, Kuala Lumpur, 4:20 pp.

SigmaStat. 2004. SigmaStat, advisory satatistics for scientists V3.1. Systat software.

Solórzano-Salazar, Y. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Licenciatura Oceanología, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, 44 pp.

Storebakken, T. & E. Austreng. 1987. Ration level for salmonids: growth, survival, body composition and feed conversion in Atlantic salmon fry and fingerlings. Aquaculture, 60: 189-206.

Tacon, A.G.J., M.R. Hasan & R.P. Subasinghe. 2006. Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trenes and policy implications. FAO Fish. Circ., Nº1018: 114 pp.

Tejada, I. 1992. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Secretaría de Educación Pública, México D.F., 397 pp.

Torres-Cobián, A.L. 2005. Respuesta de juveniles de curvina blanca *Atractoscion nobilis* a diferentes concentraciones de lípidos en la dieta. Tesis de Maestría en Ciencias en Oceanografía Costera, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, 70 pp.

Xiao-Jun, X. & S. Ruyung. 1992. The bioenergetics of the southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen): growth rate as a function of ration level and temperature. J. Fish Biol., 40: 719-730.

Zar, J.H. 1999. Bioestadistical Analysis. New Jersey, Prentice-Hall, 930 pp.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 466-472, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-8

Research Article

A bio-economic approach to analyze the role of alternative seeding-harvesting schedules, water quality, stocking density and duration of cultivation in semi-intensive production of shrimp in Mexico

Margarita Estrada-Pérez[1], Javier M.J. Ruiz-Velazco[2]
Alfredo Hernandez-Llamas[3] & Iram Zavala-Leal[2]
[1]Programa de Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias (CBAP), Universidad Autónoma de Nayarit
Cd. de La Cultura Amado Nervo s/n, Tepic, Nayarit 63255, Mexico
[2]Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit
Bahía de Matanchen Km 12, Carretera a los Cocos, San Blas, Nayarit 63740, Mexico
[3]Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Instituto Politécnico Nacional
195 Col. Playa Palo de Sta. Rita Sur, La Paz, B.C.S. 23096, Mexico
Corresponding author: Alfredo Hernandez-Llamas (ahllamas04@cibnor.mx)

ABSTRACT. We used a bio-economic model to analyze the role that alternative seeding-harvesting schedules, temperature, dissolved oxygen, stocking density, and duration of cultivation play in the economic performance of semi-intensive shrimp cultivation in Mexico. The highest production was predicted for the May-August schedule (1130-2300 kg ha^{-1}), while the lowest yields were obtained for the March-June schedule (949-1300 kg ha^{-1}). The highest net revenues were projected for the August-November schedule (US$354-1444 ha^{-1}), while the lowest was projected for the May-August schedule (US$330-923 ha^{-1}). The highest annual net revenues were predicted for the combination of the March-June and August-November schedules (US$1432-2562 ha^{-1}). Sensitivity analysis indicated temperature and dissolved oxygen were the most important factors determining net revenues in March-June schedule. For the May-August and August-November schedules, stocking density was the most important factor. Duration of cultivation was the least sensitive variable. Break-even production analysis confirmed that the combination of the March-June and August-November schedules were more efficient from an economic perspective. We recommend test some ponds with higher stocking density in the March-June and August-November schedules, and in the latter case, seeding in June or July rather than August.

Keywords: bio-economics, shrimp, seeding, harvesting, water quality, aquaculture.

Enfoque bio-económico para analizar el papel de programas de siembra-cosecha alternativos, calidad del agua, densidad de siembra y duración del cultivo en la producción semi-intensiva de camarón en México

RESUMEN. Se utilizó un modelo bio-económico para analizar el papel de programas de siembra-cosecha alternativos, temperatura, oxígeno disuelto, densidad de siembra y duración del cultivo en el desempeño económico del cultivo semi-intensivo de camarón en México. La mayor producción se predijo para el programa mayo-agosto (1130-2300 kg ha^{-1}), mientras que los rendimientos más bajos se obtuvieron con el programa marzo-junio (949-1300 kg ha^{-1}). Los mayores ingresos netos se proyectaron para el programa agosto-noviembre (US$354-1444 ha^{-1}), mientras que los menores se proyectaron para el programa mayo-agosto (US$330-923 ha^{-1}). El ingreso neto anual más alto se predijo para la combinación de los programas marzo-junio y agosto-noviembre (US$1432-2562 ha^{-1}). Un análisis de sensibilidad indicó que la temperatura y oxígeno disuelto fueron los factores más importantes en determinar los ingresos netos en el programa marzo-junio. Para los programas de mayo-agosto y agosto-noviembre la densidad de siembra fue el factor más importante. La duración del cultivo fue la variable menos sensible. El análisis de la producción en el equilibrio confirmó que la combinación de los

Corresponding editor: Patricio Dantagnan

programas marzo-junio y agosto-noviembre fue más eficiente desde una perspectiva económica. Se recomienda ensayar estanques con mayores densidades de siembra en los programas de marzo-junio y agosto-noviembre, y en el último caso, sembrar en junio o julio, en vez de agosto.

Palabras clave: bio-economía, camarón, siembra, cosecha, calidad del agua, acuicultura.

INTRODUCTION

During 2012, shrimp farms in Mexico produced 100,000 ton (CONAPESCA, 2013). About 95% of production comes from northwestern Mexico, where semi-intensive cultivation of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* is most common. Several studies have been published on bio-economics of shrimp cultivation; however, there are few antecedents in the literature of bio-economic analysis of semi-intensive production of shrimp in Mexico. Using a bio-economic model, Hernandez-Llamas & Magallón-Barajas (1991) conducted a sensitivity analysis to determine the most convenient way to improve cultivation of shrimp. Sánchez-Zazueta & Martínez-Cordero (2009) used a bio-economic approach to evaluate the economics of farm management adjustments as a response to disease risks.

Previously, we conducted a study of semi-intensive production of shrimp in northwestern Mexico and determined that cultivation programs that seeded in spring resulted in higher production of shrimp biomass, compared with production using a cultivation program that seeded in summer (Ruiz-Velazco *et al.*, 2013). Given the seasonality of shrimp market prices and the variability of costs among the alternative cultivation programs, the question arose whether higher production obtained when seeding in spring would also result in better economic performance, compared with seeding in summer. In this study, we use a bio-economic model to analyze the role that alternative seeding-harvesting schedules play in determining economic performance of semi-intensive shrimp cultivation in Mexico. In addition, we analyze the relative importance of management variables (stocking density and duration of cultivation) and water quality variables (temperature and dissolved oxygen) from a bio-economic perspective. This management and water quality variables are considered critical for semi-intensive production of shrimp (Hernandez-Llamas & Villarreal-Colmenares, 1999). The bio-economic model was calibrated from databases of farms operating in the State of Nayarit under normal conditions, that is, they were not affected by disease.

MATERIALS AND METHODS

Stock model and feed conversion ratio model

A stock model was used to predict shrimp biomass as the product of individual mean weight of shrimp and the number of surviving shrimp at different harvesting times.

In a previous study (Ruiz-Velazco *et al.,* 2013), we developed and presented the stock model together with the relationships between its parameters and water quality and management variables. The corresponding equations are presented in Table 1. Growth and survival equations were used to predict w_t and n_t in the stock model, and their parameters were made dependent on pond water temperature, dissolved oxygen, stocking density and duration of cultivation using 31 cases (ponds) and multiple linear equations. The same modeling approach was used for the feed conversion ratio model. The mean values of temperature and dissolved oxygen recorded throughout the cultivation periods were used for analysis.

Seeding-harvesting schedules

Three seeding-harvesting schedules were analyzed: March-June, May-August, and August-November. The values of water quality and management variables that correspond to the alternative schedules are presented in Table 2.

Economic model

Net revenue (nr) was calculated in US$ as a function of time: $nr_t = i_t - c_t$, where income (i_t) is the product of shrimp biomass from the stock model and shrimp market price and c_t are the costs considered for analysis, namely:

$$c_t = cfeed_t + cfer_t + ce_t + cPL + cpp + cl + cma + cmi + ch$$

where $cfeed_t$ *is* the cost of feed, $cfer_t$ is the cost of fertilizer, ce_t is the cost of energy, cPL is the cost of postlarvae, cpp is the cost of pond preparation, cl is the cost of labor, cma is the cost of maintenance, cmi is miscellaneous costs and ch is the cost of harvesting.

Farmed shrimp in Mexico is typically sold according to a farm-gate base price, and the actual sale

Table 1. Equations and functional dependence on water quality and management variables Ruiz-Velazco *et al.* (2013) used for the stock and feed conversion ratio models.

Equation	Functional dependence on water quality and management variables
$w_n = w_i + (w_f - w_i)\,[(1 - k^n)/(1 - k^h)]^3$	$w_f = -25.24 + 0.96\,T + 0.53\,DC$
where, w_n = shrimp weight after n time events have passed, w_i = initial weight, wf = final weight, k = growth coefficient, h = time events that have passed until harvesting time	where, T = pond water temperature, DC = duration of cultivation
	$z = 0.0916 - 0.0081\,DO + 0.0010\,D - 0.0034\,DC$
	where, DO = dissolved oxygen, D = stocking density
$n_t = n_0\,e^{-z\,t}$	$a = 1.49 - 0.031\,T$
where, n_t = surviving shrimp at time t, n_0 = initial population, z = mortality rate	
$FCR_t = a + bt$	
where, FCR = feed conversion ratio and a and b = regression coefficients	

Table 2. Range values of water quality and management variables corresponding to the alternative production programs.

Variable	Production program					
	March-June		May-August		August-November	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Temperature (°C)	30.04	32.2	31.8	32.1	30.5	32.6
Dissolved oxygen (mg L^{-1})	3.73	6.5	3.6	4.2	3.8	4.8
Stocking density (postlarvae m^{-2})	13	17	16	37	14	25
Duration of cultivation (weeks)	9.5	12	9.5	13	9	14

price is calculated by adding, to the base price, US$ 0.074 for every gram corresponding to the mean individual weight of shrimp. For example, if the base price is US$2.22 kg^{-1} and the mean weight of shrimp is 15 g, the sale price is US$3.7 kg^{-1}. Shrimp price was predicted on a monthly basis from January through December, using a fourth order polynomial (Fig. 1). The estimates of costs analyzed are presented in Table 3.

Break-even production (*bep*) was calculated according to Parkin (1996): $bep = c_f / (i_s - c_v)$, where c_f are fixed costs, i_s is the income per kilogram of produced shrimp and c_v are the variable costs needed to produce a km of shrimp.

Management schemes

In a previous work (Ruiz-Velazco *et al.,* 2013), we determined the combinations of stocking density and duration of cultivation that minimize and maximize production of shrimp biomass in the seeding-harvesting schedules. The lowest stocking density and the shortest duration of cultivation minimize production, whereas the highest stocking density and longest duration of cultivation maximize production. Intermediate values of the management variables were used to define complementary management schemes, and the corresponding

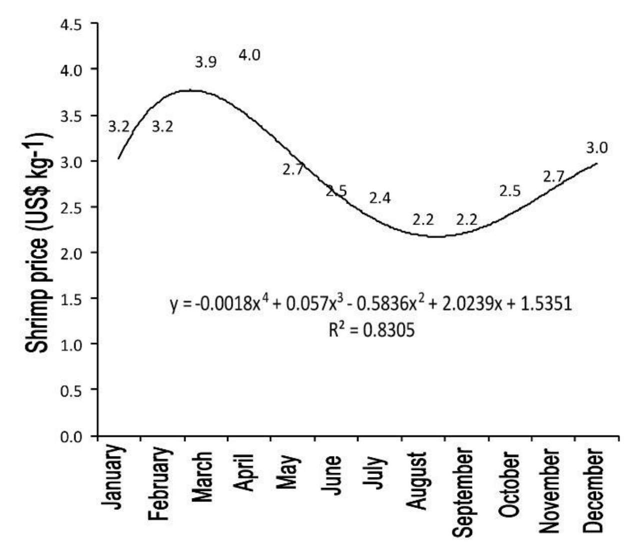


Figure 1. Seasonal variability of shrimp prices and polynomial curve fitted for prediction.

Table 3. Costs considered for analysis.

Cost	US$
Postlarvae ($/thousand)	4.62
Feed ($ kg^{-1})	0.92
Fertilizers ($ kg^{-1})	0.92
Energy ($ kwh^{-1})	0.20
Pond preparation ($ ha^{-1} yr^{-1})	115.38
Labour ($ ha^{-1} yr^{-1})	2,352.00
Maintenance ($ ha^{-1} yr^{-1})	481.15
Miscelaneous ($ ha^{-1} yr^{-1})	157.31
Harvesting ($ shrimp kg^{-1})	0.15

production was calculated. We use a similar approach to determine if the lowest and highest net revenues would be obtained using the combinations of values of the management variables that minimized and maximized production. The combination of values for the management variables corresponding to the three schedules and management schemes are presented in Table 4.

Software and sensitivity analysis

As described in Ruiz-Velazco *et al.* (2013), the multiple linear regression procedure available in Stata 13 (Stata Corp, College Station, TX) was used to fit the equations that allowed predicting parameters of the stock model as a function of water quality and management variables. According to the methods described in Rencher (2002), this is a regression procedure dealing automatically with multicollinearity; tests for violation of linear regression assumptions available in Stata 13 indicated normality and homoscedasticity in the data.

Sensitivity of net revenues to changes in the values of the water quality and management variables was determined using the range of values of the variables recorded in the database. This analysis allowed us to determine the contribution, that is, the importance that each variable has on economic output. The bio-economic model was programmed using worksheets of Excel 2007, and sensitivity analysis was conducted with procedures available in @Risk 5.5 Industrial (Palisade, Ithaca, NY).

RESULTS

Predicted shrimp production increased from management scheme 1 through management scheme 5 in all the seeding–harvesting schedules (Fig. 2). Higher yields were predicted for the May-August schedule (1,130-2,300 kg ha^{-1}) and lower yields were predicted for the March-June schedule (949-1,300 kg ha^{-1}).

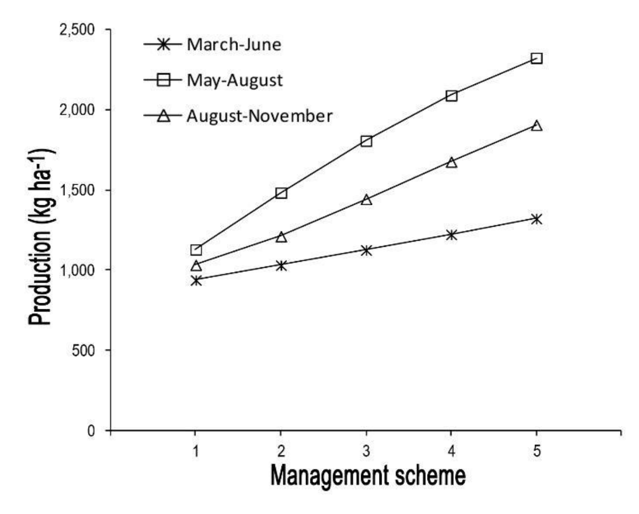


Figure 2. Shrimp production calculated for alternative management schemes and cultivation schedules.

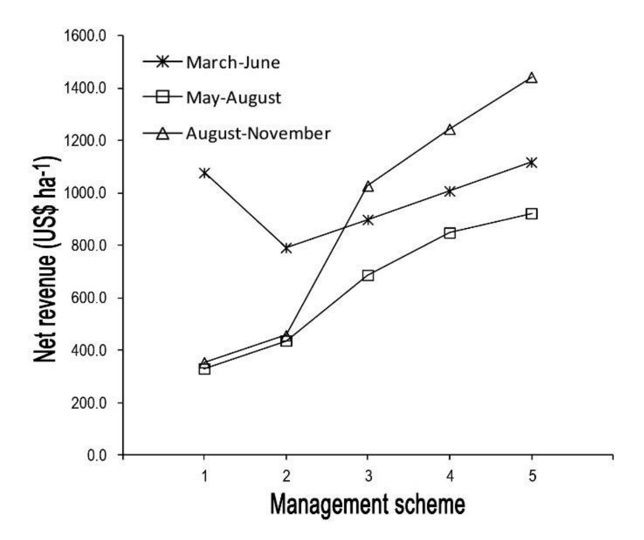


Figure 3. Net revenues calculated for alternative management schemes and three cultivation schedules.

Net revenues varied with the schedules and management schemes (Fig. 3). For March-June, revenues varied from US$1,078 ha^{-1} (scheme 1) to US$1,118 ha^{-1} (scheme 5); for May-August revenues varied from US$330 ha^{-1} (scheme 1) to US$923 ha^{-1} (scheme 5); for August-November, revenues varied from US$354 ha^{-1} (scheme 1) to US$1,444 ha^{-1} (scheme 5).

Annual net revenues from the combination of production schedules varied (Fig. 4). For the combination of March-June and August-November, net revenues varied from US$1,432 ha^{-1} (scheme 1) to US$2,562 ha^{-1} (scheme 5). For the combination of May-August and August-November net revenues varied from US$684 ha^{-1} (scheme 1) to US$2,367 ha^{-1}

Table 4. Values of the management variables used to define the management schemes for the alternative cultivation programs.

Management schemes	Cultivation program					
	March-June		May-August		August-November	
	Stocking density (postlarvae m^{-2})	Duration of cultivation (weeks)	Stocking density (postlarvae m^{-2})	Duration of cultivation (weeks)	Stocking density (postlarvae m^{-2})	Duration of cultivation (weeks)
1	13	9.5	16	9.5	14	9
2	14	10.125	21.25	10.375	16.75	10.25
3	15	10.75	26.5	11.25	19.5	11.5
4	16	11.375	31.75	12.125	22.25	12.75
5	17	12	37	13	25	14

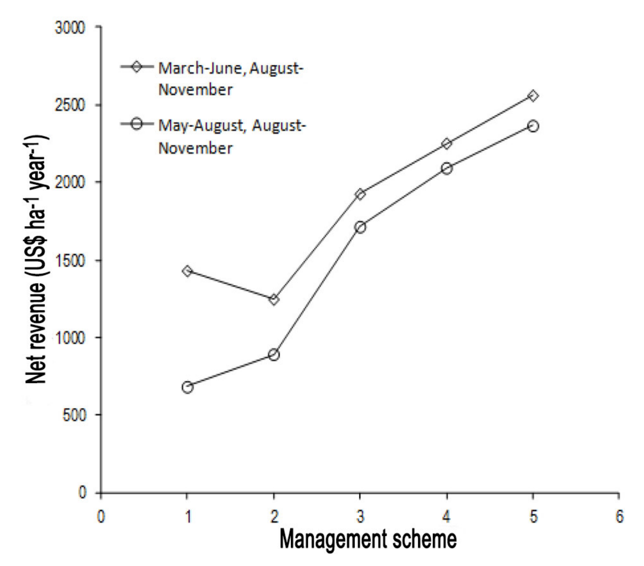


Figure 4. Net revenues calculated for alternative management schemes and combinations of cultivation schedules.

(scheme 5). The differences in net revenue when using schemes 1 and 5 represent increases of 246.0% for the first combination and 78.9% for the second one.

Sensitivity analysis indicated that temperature and dissolved oxygen were the most influential factors determining net revenues in the March-June schedule (Fig. 5). Stocking density was the most influential factor in the May-August and August-November schedules. Duration of cultivation was the least sensitive variable in the schedules.

Break-even production analysis showed that the combination of the March-June and August-November schedules was more efficient, from the economic point of view, than the combination of May-August and August-November. For the first combination, and depending on the management scheme, it was necessary to produce 543-647 kg ha^{-1} yr^{-1} to obtain a break-even condition, whereas for the second combination it was necessary to produce 766-936 kg

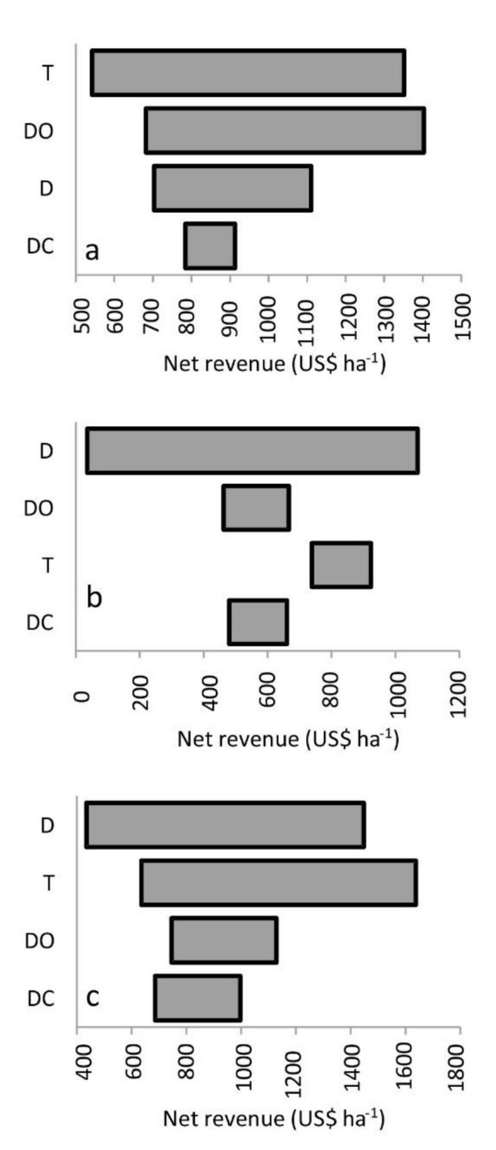


Figure 5. Sensitivity of net revenues to temperature (T), dissolved oxygen (DO), stocking density (D), and duration of cultivation (DC) for three schedules: a) March-June, b) May-August, and c) August-November. Wider bars indicate higher sensitivity.

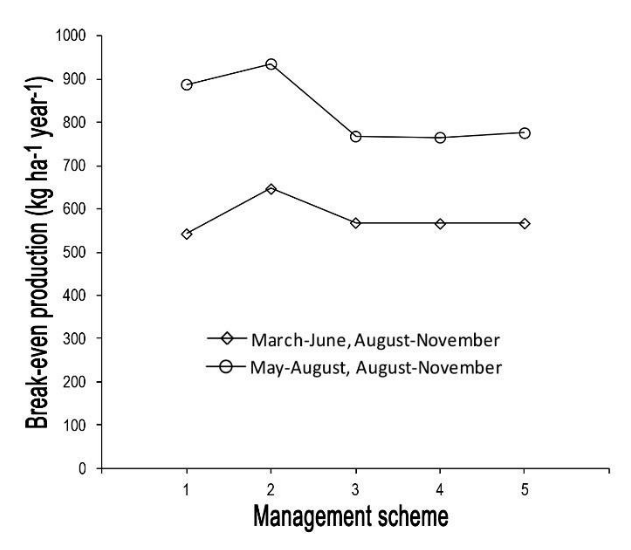


Figure 6. Break-even production calculated for alternative management schemes and combinations of cultivation programs.

ha^{-1} yr^{-1} (Fig. 6). This means that it was necessary to use at least 17.6%-28.8% (first combination) and 18.3%-41.1% (second combination) of the total production capacity to obtain a break-even condition.

DISCUSSION

The highest net revenues were obtained for the August-November schedule. Using this schedule, together with the March-June schedule resulted in the highest annual net revenues. The May-August schedule yielded the highest biomass production of shrimp, although it also produced the lowest net revenues, indicating that economic performance of the seeding–harvesting schedules was strongly influenced by the seasonal variability of shrimp prices.

The importance of shrimp price cannot be overemphasized. Previous analyses show that it is a major factor determining economic outcome of semi-intensive and intensive cultivation of shrimp (Hernandez-Llamas & Magallón-Barajas, 1991; Hernandez-Llamas & Zarain-Herzberg, 2011; Hernandez-Llamas *et al.,* 2013). In this study, net revenues rose as stocking density and duration of cultivation increased from management scheme 1 to scheme 5, with the exception of scheme 1 of the March-June schedule. In this case, the use of the shortest cultivation period simulated harvesting in May, when shrimp prices are still relatively high, resulting in net revenue similar to that obtained when using the best scheme 5. The best economic performance occurred for the August-November schedule, when shrimp prices tend to rise (September to November). The May-August schedule had the highest stocking densities and produced the highest shrimp biomass; however, it produced the poorest economic output. This was a consequence of low shrimp prices in August (lowest during the year). The relevance of shrimp price for designing and scheduling cultivation programs calls for implementing detailed databases of shrimp prices and accounting for changes in price on a weekly, rather than a monthly basis.

Sensitivity analysis indicated the relevance of water quality and management variables in determining net revenues. The relevance of the variables is dependent on: (1) the role they play within the structure of the bio-economic model, and (2) variability they show in the database, which reflects what historically has occurred at the farms that were studied. Stocking density was most important, except in the March-June schedule when the range in stocking density was narrow (13 to 17 postlarvae m^{-2}). In contrast, the range of dissolved oxygen for this production schedule is wider, compared to the two other schedules, resulting in dissolved oxygen as the most important factor during March-June. Duration of cultivation was consistently the least sensitive variable in all cases, indicating that farmers prefer to keep this management factor within narrow limits.

Ruiz-Velazco (2011) calculated that at least 43% of total production capacity should be used to obtain a break-even situation for intensive production of shrimp *L. vannamei.* Hernandez-Llamas *et al.* (2004) calculated that 53% of the total production capacity was necessary for a break-even situation for the intensive production of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris.* For semi-intensive production of whiteleg shrimp *L. vannamei*, we calculated a lower percentage than the amount previously reported, indicating possible operation and economic advantages of semi-intensive cultivation of whiteleg shrimp.

We found that the highest net revenues were obtained by using extended durations of cultivation and the highest stocking densities (management scheme 5). This agrees with reports on shrimp cultivation under intensive conditions, in floating cages and ponds (Hernandez-Llamas & Zarain-Herzberg 2011; Hernandez-Llamas *et al.,* 2013).

CONCLUSION

From an economic perspective, we conclude that the combination of the March-June and August-November schedules is preferable to the combination of May-August and August-November. We recommend testing some ponds with higher stocking density during the March-June and August-November schedules and, for

the latter schedule, seeding earlier in June or July rather than August.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the shrimp farmers in the State of Nayarit for their cooperation, especially the firm of Encarnación Torres García. Ira Fogel of CIBNOR provided valuable editorial services. M.E.P. was a recipient of a graduate fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico.

REFERENCES

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). 2013. Anuario estadístico de acuacultura y pesca. [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca]. Reviewed: 12 May 2014.

Hernandez-Llamas, A. & F.J. Magallón-Barajas. 1991. Análisis bioeconómico del cultivo del camarón azul (*Penaeus stylirostris*) con fertilizantes orgánicos e inorgánicos y alimentación balanceada. Invest. Mar. CICIMAR, 6: 267-281.

Hernandez-Llamas, A. & H. Villarreal-Colmenares. 1999. TEMA: a software reference to shrimp *Litopenaeus vannamei* farming practices. Aquacult. Econ. Manage., 3(3): 267-280.

Hernandez-Llamas, A. & M. Zarain-Herzberg. M. 2011. Bioeconomic modeling and risk analysis of raising shrimp *Litopenaeus vannamei* in floating cages in northwestern Mexico: assessment of hurricane hazard, stochastic variability of shrimp and feed prices, and zootechnical parameters. Aquaculture, 314: 61-268.

Received: 17 May 2014; Accepted: 24 December 2014

Hernandez-Llamas, A., J.M.J. Ruiz-Velazco & V.M. Gómez-Muñoz. 2013. Economic risk associated with white spot disease and stochastic variability in economic, zootechnical and water quality parameters for intensive production of *Litopenaeus vannamei*. Rev. Aquacult., 5: 121-131.

Hernandez-Llamas, A., A. Gonzalez-Becerril, S. Hernandez-Vazquez & S. Escutia-Zuñiga. 2004. Bioeconomic analysis of intensive production of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). Aquacult. Res., 35: 103-111.

Parkin, M. 1996. Microeconomía. Addison-Wesley Iberoamericana, México DF, 247 pp.

Rencher, A.A. 2002. Methods of multivariate analysis. John Wiley & Sons, New York, 2: 708 pp.

Ruiz-Velazco, J.M.J. 2011. Modelo bioeconómico para el análisis del riesgo del cultivo intensivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Doctoral Thesis. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S., 127 pp.

Ruiz-Velazco, J.M.J., M. Estrada-Pérez, A. Hernandez-Llamas, J.T. Nieto-Navarro & E. Peña-Messina. 2013. Stock model and multivariate analysis for prediction of semi-intensive production of shrimp *Litopenaeus vannamei* as a function of water quality and management variables: a stochastic approach. Aquacult. Eng., 56: 34-41.

Sánchez-Zazueta, E. & F.J. Martínez-Cordero. 2009. Economic risk assessment of a semi-intensive shrimp farm in Sinaloa, Mexico. Aquacult. Econ. Manage., 13: 312-327.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 473-483, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-9

Research Article

Temperaturas letales superiores para el mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), en la costa de Chile central

Andrés Mesas[1,2,3] & Eduardo Tarifeño[1]
[1]Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile
[2]Instituto de Ciencias Ambientales y Evolutivas, Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile, Independencia 641, Valdivia, Chile
[3]Doctorado en Ciencias mención Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile, Independencia 641, Valdivia, Chile
Corresponding author: Andrés Mesas (andresmesasp@gmail.com)

RESUMEN. La presencia de *Mytilus galloprovincialis*, conocido mundialmente como mejillón del mediterráneo, ha sido verificada genéticamente desde bahía Coliumo hasta el Estrecho de Magallanes, en la costa central y sur de Chile respectivamente. Para relacionar la distribución geográfica de esta especie con su tolerancia fisiológica a temperaturas altas, se realizaron experimentos con estados larvarios y adultos. Trocóforas y estados larvales velígera umbonada y premetamórficas fueron sometidas a temperaturas entre 17 y 33°C, durante 24 h para determinar el límite termal letal superior. Los experimentos de mejillones adultos fueron realizados con individuos de diferentes condiciones fisiológicas previas: aclimatados a primavera-verano (noviembre-enero) y otoño-invierno (agosto-octubre), y expuestos a un rango termal de 17-33°C por un período de 24, 48, 72 y 96 h para verificar mortalidad y presencia de biso. Los resultados indicaron que la mortalidad de larvas pre-metamórficas fue de 50% a 27°C y de 100% a 30°C. En adultos, el 55% mortalidad ocurrió en individuos expuestos por 48 h a 30°C y el 100% a 72 h a la misma temperatura. La formación del biso se debilitó sobre 27°C y cesa a 30°C.

Palabras clave: *Mytilus galloprovincialis*, historia de vida, ectotermo, tolerancia termal, acuicultura.

Upper lethal temperatures for the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), in central coast of Chile

ABSTRACT. The presence of *Mytilus galloprovincialis*, widely known as the Mediterranean mussel, have been genetically certified from Coliumo Bay to the Magellan Strait, in central and southern Chile, respectively. To correlate the geographic distribution of this species along the Chilean coast with its physiological tolerance to upper temperatures, experiments were carried out with adults and larval stages. Trochophore, umbonate veliger, and pre-metamorphic larvae were submitted to experimental temperatures from 17-33°C, during 24 h to determine the upper temperature limit. Meanwhile, adult experiments were carried with specimens having different previous physiological background: spring-summer acclimation (November-January), and fall-winter acclimation (August-October) and exposed to temperature range of 17-33°C for period of 24, 48, 72 and 96 h, to verify mortality and byssus formation. Results showed that at larvae stages, the 50% of mortality occurred at 27°C, with 100% mortality at 30°C. Adult stages reached the 55% mortality exposed for 48 h at 30°C and 100% mortality in 72 h at the same temperature. The byssus secretion become failing at 27°C and ceased at 30°C.

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, life history, ectotherms, thermal tolerance, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

Entre los factores ambientales que afectan la biología de los animales marinos, la temperatura es un factor importante, reconocido como responsable causal de la distribución de especies (Shuchanek *et al.*, 1997; Braby & Somero, 2006); existiendo correlaciones con la latitud, batimetría y distancia a la costa (Urban, 1994; Hicks & McMahom, 2002; Cole & McQuaid, 2010). Es conocido que la temperatura del mar es uno de los princi-

Corresponding editor: Cesar Lodeiros

pales factores ambientales que determina las tasas metabólicas en invertebrados marinos (Drinkwater, 2010), dado que los organismos responden adaptándose a los cambios de temperatura, involucrando tanto la capacidad de tolerancia a la nueva temperatura específica, como también la habilidad de hacer frente a un nuevo rango de temperatura (Newell, 1976). Esta adaptabilidad es producto de la historia de vida previa de los organismos, donde cambios en el material genético, beneficiados frente a variaciones ambientales, pudieron ocurrir durante varias generaciones, determinando los límites superior e inferior de tolerancia termal en un momento determinado (Bayne, 1976).

El mejillón *Mytilus galloprovincialis* es citado con amplia distribución y ha sido introducido en diferentes costas del mundo, por medio del agua de lastre de barcos (Branch & Steffani, 2004; Lee & Chown, 2007; Lockwood & Somero, 2011), adherido a los cascos de embarcaciones transoceánicas o incluso encontrado en cascos de buques que visitan regularmente el Océano Ártico (Lee & Chown, 2007).

M. galloprovincialis, se cultiva masivamente en aguas costeras de Galicia, España, donde se ha establecido una amplia y exitosa industria de mitilicultura, generando trabajo e ingresos en base al cultivo de este mejillón, situación que también está ocurriendo en China (www.fao.org/fishery/cultured species/Mytilus_galloprovincialis/es).

Para *M. galloprovincialis* la temperatura del mar y el gradiente termal son factores a considerar en la selección de un sitio apto para el cultivo con fines comerciales, junto con otros factores como la calidad y disponibilidad de alimento, corrientes marinas, oleaje y disponibilidad de oxígeno disuelto (Sicard *et al*., 2006).

En Chile, la presencia de *M. galloprovincialis* ha sido reportada desde 1997 (Sanjuan *et al.,* 1997; Cárcamo *et al.,* 2005) y su certificación genética lo sitúa con certeza desde Bahía Coliumo (36°32'S, 72°56'W; Tarifeño *et al.*, 2012) hasta el Estrecho de Magallanes (53°35'S, 70°51’W; Toro *et al.,* 2005). Actualmente, se está evaluando su cultivo en pequeña escala en las llamadas “áreas de manejo” administradas por organizaciones de pescadores artesanales, tomando en cuenta que alcanza la talla comercial (5-6 cm) en menor tiempo (6 meses) que el mejillón chileno, *Mytilus chilensis* (12-18 meses). Esto posiciona a *M. galloprovincialis,* conocido en Chile como “choro araucano” como una interesante alternativa de cultivo en la costa norte y central de Chile, y como una especie que permitiría diversificar la matriz de cultivos de mitílidos, que hasta la fecha está basada casi exclusivamente en el mejillón chileno (*M. chilensis*).

En Bahía Coliumo y Bahía de Concepción (36°43'S, 73°03'W) de Chile central, se encuentran poblaciones naturales de *M. galloprovincialis* que están ubicadas a la menor latitud en la costa del Pacífico suroriental (Tarifeño *et al.,* 2012), experimentando notables variaciones de temperaturas del mar. Para Bahía Coliumo se dispone una base de datos de 10 años (enero 2000-noviembre 2009), con la temperatura superficial registrada tres veces al día, determinándose que la temperatura máxima registrada en dicho período ha sido 21,3°C, el 8 febrero de 2008 (Estación de Biología Marina, Universidad de Concepción; datos no publicados).

Debido al amplio rango latitudinal de la costa de Chile (18-56°S), en el extremo norte (Arica) se han registrado temperaturas de hasta 24,8°C, mientras que en la costa central (Talcahuano) se registran 18,2°C en verano (Tarifeño *et al.,* 2008). Además, se debe considerar que la costa de Chile es afectada aperiódicamente por eventos de El Niño, que puede incrementar en más de 5°C el promedio de verano, fuera de los rangos promedios en períodos neutros o más fríos (Maturana *et al.,* 2004).

Para conocer los potenciales límites termales superiores de la distribución natural, como base fisiológica para el posible cultivo comercial del “mejillón araucano”, es importante conocer sus capacidades fisiológicas frente a alta temperatura superficial del mar. El presente trabajo determina las temperaturas letales superiores de estados larvales y adultos del mejillón, *M. galloprovincialis,* en la costa central de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de ejemplares

Los experimentos para determinar la temperatura letal superior de *M. galloprovincialis* se realizaron con larvas y adultos (5-7 cm) obtenidos desde líneas de cultivos de mitílidos en la concesión de acuicultura de la Universidad de Concepción en Bahía Coliumo. En estos sistemas de cultivo, los mejillones se fijan y crecen en forma silvestre a partir de bancos naturales existentes en dicha bahía. Las larvas fueron obtenidas a partir de desoves controlados de adultos. Los experimentos se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Producción de Semillas (UPROS), Estación de Biología Marina (Dichato) y Departamento de Zoología de la Universidad de Concepción, Chile.

Preparación del agua

El agua de mar utilizada en los experimentos con larvas fue filtrada a 0,5 µm, esterilizada con luz UV y la

salinidad fue regulada a 30. Para los adultos, se utilizó agua de mar sin filtrar regulada a 35, asemejando las condiciones naturales o en sistemas de cultivo.

Las temperaturas experimentales se obtuvieron usando un calefactor eléctrico con control termo-estático, sumergido en agua de mar en estanques de 5 L con aireación constante. En todos los casos, el tratamiento control fue a 17°C, por ser la temperatura óptima para el desarrollo y crecimiento larvario del mejillón en instalaciones de incubadora (Ruiz *et al.*, 2008).

Tratamientos de los estado*s* larvales

Para la obtención de los estado*s* larvales trocófora, velígera umbonda y pre-metamórfica, se seleccionaron reproductores (>5 cm) con desarrollo gonádico avanzado, para su posterior acondicionamiento e inducción a la emisión de gametos a través de la técnica de shock térmico (Bayne, 1976). Al iniciar la liberación de los gametos, los mejillones fueron trasladados a un estanque con 5.000 L de agua de mar filtrada a 17ºC, dando inicio a la fecundación. Antes de iniciar los tratamientos, se evaluaron las condiciones fisiológicas, anatómicas y densidad de los cultivos larvales para asegurar condiciones adecuadas de tamaño, movimiento de la corona ciliar, morfología y movimiento del pie.

Los estadios larvales no presentan órganos ni estructuras desarrolladas que les brinden la misma tolerancia o protección frente a variables ambientales, a diferencia de individuos adultos. Por esto, se decidió que los tratamientos termales difirieran entre las etapas de desarrollo del mejillón.

Larvas trocófora y velíger umbonada se sometieron a 17, 20, 23, 25 y 27°C, mientras que a larvas pre-metamórficas se les aplicó las temperaturas anteriores, más un tratamiento a 30°C. Para cada tratamiento termal se utilizaron 400 larvas trocóforas, 600 larvas velíger umbonada y 300 larvas pre-metamórficas, en placas Petri profundas de 60 mm. Luego, cada placa Petri fue sellada y depositada en un recipiente con agua de mar calefaccionada, según el tratamiento termal. Cada tratamiento fue realizado en tres réplicas. Luego de 24 h de exposición, las placas Petri fueron removidas y se verificó el estado de condición de las larvas con un microscopio óptico.

En larvas trocófora, debido a que no presentan estructuras duras, la mortalidad fue cuantificada mediante la resta al número inicial de larvas (400) de aquellas larvas, que posterior al tratamiento, presentaron una charnela recta. En los restantes estados larvales, la mortalidad se cuantificó bajo el criterio de ausencia de natación, inmovilidad en el fondo de la placa o ausencia de actividad ciliar.

Tratamientos del estado adulto

Los experimentos se realizaron en dos etapas de acuerdo a las temperaturas superficiales en Bahía Coliumo. En la primera etapa se recolectaron mejillones durante el período de aguas cálidas (enero a febrero) y en la segunda etapa se recolectaron en el período de aguas frías (octubre a noviembre). El objetivo de realizar experimentos con grupos de mejillones con diferente historia fisiológica previa, fue para determinar si existía un cambio en los límites letales superiores, de acuerdo a las condiciones ambientales previas. Los mejillones de la temporada cálida fueron sometidos a 17, 27, 30 y 33°C. Cada tratamiento se realizó en triplicados de 15 individuos. Luego de 24 h, los mejillones se retiraron y traspasaron al sistema de recuperación, durante 1 h a 17°C. Para determinar si el mejillón aún se encontraba con vida, se examinó la reacción a estímulos punzantes en el músculo abductor.

Debido a la pérdida total de los sistemas de cultivo e instalaciones de la Estación de Biología Marina por el maremoto del 27 febrero 2010, en la segunda etapa los mejillones se recolectaron desde un muelle de la localidad de Tomé, adyacente a Bahía Coliumo. Los mejillones de la temporada fría, al presentar menos estrés térmico, fueron sometidos a tratamientos termales con menor diferencia entre ellos, para así determinar en detalle la tolerancia termal superior del mejillón. Estos mejillones se sometieron a tratamientos de 17, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33°C durante 24, 48, 72 y 96 h. Cada tratamiento se realizó en cuatro réplicas de 10 mejillones cada una. Luego de cada período de exposición, los mejillones se traspasaron al sistema de recuperación, durante 1 h a 17°C y se verificó si los individuos aún estaban vivos, mediante estímulos punzantes en el músculo abductor.

Presencia de biso

Una parte del gasto rutinario de energía en los mejillones que se fijan al sustrato, es la formación del biso para no ser desplazados desde el punto de asentamiento. Por esta razón, la presencia de biso, puede ser considerado como un índice sub-letal de estrés en los mejillones sometidos a alguna condición ambiental fuera de sus rangos normales. Es por esto, que la presencia o ausencia de biso fue cuantificada en los mejillones de la temporada fría, luego de cada período de exposición termal.

Análisis estadístico

Los datos se distribuyeron de forma no normal (Prueba de Shapiro-Wilk, $P < 0{,}001$) y fueron heterocedásticos (Prueba de Levene, $P < 0{,}001$). Como las transformaciones estadísticas no resolvieron el problema de distribución y heterocedasticidad, se realizó un análi-

sis de varianza de permutación variable PERMA-NOVA (Anderson, 2001).

En los análisis estadísticos de los estados larvales, la variable dependiente fue la mortalidad frente a la variable independiente temperatura. En adultos se incorporó el tiempo de exposición a las variables independientes. Los datos se analizaron convertidos en porcentaje del total de individuos de cada réplica, usando medida de disimilaridad Euclidiana y 9999 permutaciones en el programa estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2001). Adicionalmente, a todos los resultados se les determinó el polinomio con mejor ajuste (Tabla 1) y el intervalo de confianza del 95% para la media de cada tratamiento.

RESULTADOS

Mortalidad de larvas trocófora

Antes de los tratamientos térmicos, todas las trocóforas presentaron un flagelo apical bien desarrollado y una natación activa, lo que indicaba condiciones normales para su pleno desarrollo. La mortalidad del estado trocófora no mostró una clara relación con la temperatura, dado que los promedios (60-75% de supervivencia) no difirieron entre sí. El análisis de PERMANOVA univariado no indicó diferencias significativas (Pseudo-F (4,2045) = 2,588; P = 0,799; Tabla 2). Sin embargo, a 27°C se observó la menor mortalidad, pero con mayor desviación de los datos (Fig. 1).

Mortalidad de larvas velíger umbonadas

Antes de los tratamientos, las larvas velíger umbonadas presentaron una natación disminuida a consecuencia de la normal regresión del velo y se caracterizaron por presentar una charnela semicurva, estómago bien definido y septos branquiales en desarrollo.

Se observó una baja mortalidad en todos los tratamientos (0-3%), en algunos siendo menor que la registrada en la temperatura control. Las máximas mortalidades se alcanzaron a 25 y 27°C (Fig. 2). El análisis de PERMANOVA no evidenció diferencias significativas en el efecto de la temperatura sobre la mortalidad larval (Pseudo-F (4,3045) = 2,313; P = 0,087; Tabla 2).

Mortalidad de larvas pre-metamórficas

Las larvas pre-metamórficas, antes de los tratamientos, no presentaron movilidad natatoria, producto de la completa regresión del velo; en cambio, el órgano pedal se encontró bien desarrollado y activo, acorde al inicio del asentamiento. En esta etapa larvaria también se observó la charnela claramente umbonada, estómago definido, músculos abductores y septos branquiales desarrollados.

Los resultados indicaron una reducida mortalidad (1-3%) entre 17 y 25°C, pero a temperaturas mayores la mortalidad se incrementó significativamente, con una temperatura letal para el 50% (TL_{50}) de las larvas a 27ºC y una temperatura letal para el 100% (TL_{100}) de las larvas a 30ºC. El análisis de PERMA-NOVA evidenció la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos térmicos (Pseudo-F (5,1974) = 140,9; P = 0,0001; Tabla 2), coincidiendo con la no existencia de sobreposición en los intervalos de confianza del 95% para la media de los tratamientos (Fig. 3).

Lo anterior indica que las temperaturas >25°C disminuyen notoriamente la supervivencia de las larvas pre-metamórficas. Posterior a la exposición a los tratamientos, las larvas sobrevivientes mantuvieron una alta actividad del órgano pedal, desplazándose activamente sobre el fondo de las placas Petri.

Mortalidad en adultos

Los mejillones adultos (>5 cm) provenientes de un período cálido presentaron mortalidad nula entre 17 y 27°C. La mortalidad se incrementó hasta el 50% a 30°C; finalmente alcanzando el 100% de la mortalidad a 33°C (Fig. 4). El análisis de PERMANOVA evidenció diferencias significativas en el efecto de la temperatura sobre la mortalidad (Pseudo-F (3,180) = 2148; P = 0,0012; Tabla 3), siendo reflejado en los intervalos de confianza del 95% para la media de los tratamientos (Fig. 4).

Los mejillones de la temporada fría, no presentaron mortalidad entre 17 y 28°C en todos los períodos de exposición. Luego de 48 h a 30°C, la mortalidad se incrementó al 55% (TL_{50}) (Fig. 5). El 100% de la mortalidad se alcanzó cuando los mejillones fueron sometidos por 72 h a 30°C (Fig. 5).

El análisis de PERMANOVA evidenció un efecto significativo sobre la mortalidad por parte de la temperatura (P = 0,0001; Tabla 4), del tiempo de exposición (P = 0,0001; Tabla 4) y de la interacción de estos factores (P = 0,0001; Tabla 4), coincidiendo con los intervalos de confianza del 95% para la media (Fig. 5).

Formación de biso en adultos

La totalidad de los mejillones de la temporada fría presentaron biso a las 24 h entre 17 y 28°C, encontrándose adheridos entre sí o a las paredes del recipiente. Sin embargo, al incrementar la temperatura y el período de exposición, el porcentaje de presencia de biso disminuyó. A 27 y 28°C la presencia de biso fue de 65 y 45%, respectivamente, a las 96 h de exposición. En temperaturas mayores a 29°C no se registró presencia de biso, independiente del tiempo de exposición (Fig. 6).

Tabla 1. Ecuaciones de los modelos polinomiales con mejor ajuste a los datos de mortalidad y presencia de biso en los diferentes estados de desarrollo de *M. galloprovincialis.*

Mortalidad en estados larvales					
Estados larvales	R^2	Intercepto	X	X^2	X^3
Trocófora	0,988	100,49	-38,103	14,441	-1,684
Umbonada	0,965	3,519	4,641	1,794	-0,178
Pre-metamórfica	0,974	3,771	1,306	-4,200	1,088
Mortalidad en adultos temporada cálida					
Período	R^2	Intercepto	X	X^2	X^3
24 h	0,992	451,91	-43,614	1,0007	
Mortalidad en adultos temporada fría					
Temperatura	R^2	Intercepto	X	X^2	X^3
29°C	0,982	0,071	-0,037	0,001	
30°C	0,999	-0,286	-1,448	0,081	-0,00057
31°C	0,989	1,143	-1,220	0,058	-0,00036
32°C	0,987	1,786	2,924	-0,020	
33°C	0,995	0,714	5,357	-0,088	0,00045
Presencia de biso en adultos					
Temperatura	R^2	Intercepto	X	X^2	X^3
17°C	0,545	98,125	0,078	-0,001	
27°C	1	145,000	-2,778	0,043	-0,000241
28°C	0,872	120,625	-1,068	0,003	
29°C	0,7	-8,750	0,500	-0,004	

Tabla 2. Análisis de PERMANOVA, con el efecto de la temperatura sobre la mortalidad de los estados larvales de *M. galloprovincialis* ($P < 0{,}05$). El análisis se construyó en base a medidas de distancia Euclidiana. Suma total de cuadrados (StC) y suma de cuadrados intragrupo (SCintra).

Permutaciones N: 9999	Medida de distancia Euclidiana			
Estados larvales				
Mortalidad	StC	SCintra	F	*P*
Larva trocófora	569,90	248,40	2,588	0,7990
Larva velíger umbonada	40,11	20,42	2,313	0,0870
Larva pre-metamórfica	2,28E+04	383,00	140,90	0,0001

El análisis de PERMANOVA evidenció efectos significativos solo de la temperatura sobre la presencia de biso ($P = 0{,}001$; Tabla 4), no siendo significativo el efecto del período de exposición ($P = 0{,}193$; Tabla 4), ni la interacción de ambos factores ($P = 0{,}893$; Tabla 4). Esto es coincidente con los intervalos de confianza trazados para la media de cada tratamiento (Fig. 6).

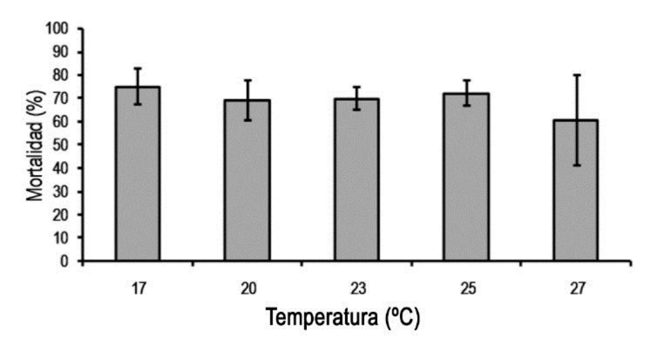


Figura 1. Mortalidad promedio del estado larvas, trocófora de *M. galloprovincialis*, al ser expuestas a cinco temperaturas diferentes por 24 h. Las líneas verticales son intervalos de confianza del 95% para las medias de los tratamientos.

DISCUSIÓN

La temperatura del mar está entre los factores ambientales más influyentes del océano, ya que afecta la distribución vertical y horizontal de los organismos marinos; además influye en el metabolismo de los organismos durante su desarrollo.

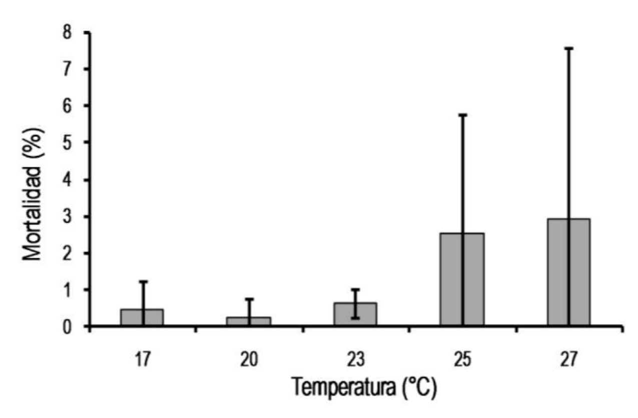


Figura 2. Mortalidad promedio de las larvas velíger umbonada de *M. galloprovincialis*, al ser sometidas a cinco diferentes temperaturas por 24 h. Las líneas verticales son intervalos de confianza del 95% para las medias de los tratamientos.

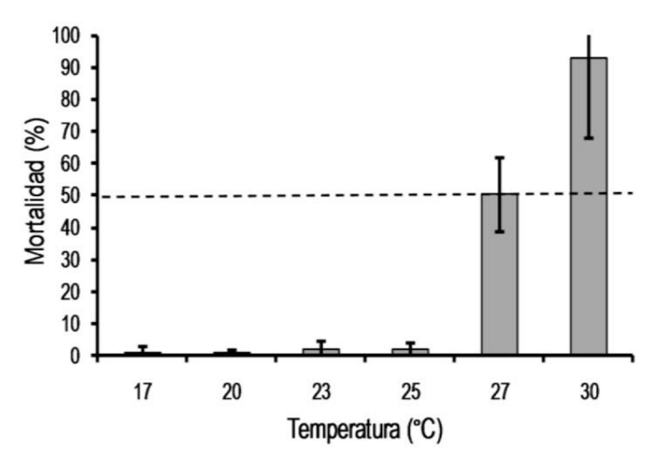


Figura 3. Mortalidad promedio de la larva pre-metamórfica de *M. galloprovincialis*, al ser sometidas a seis diferentes temperaturas por 24 h. Las líneas verticales son intervalos de confianza del 95% para las medias de los tratamientos. La línea segmentada indica la TL_{50}.

Para el mejillón, *M. galloprovincialis* presente en Bahía Coliumo, los resultados de este estudio en larvas trocófora muestran una leve disminución de la mortalidad con el aumento de la temperatura (>17°C). Sin embargo, la mortalidad fue alta (65-75%) en esta etapa larval, incluso entre 17 y 20°C, rango de temperaturas donde se registró el máximo crecimiento en cultivos masivos bajo condiciones controladas en hatchery (Ruiz *et al.*, 2008). Esta alta mortalidad se puede atribuir a la formación de la prodisoconcha-I y al cambio en la forma de movilización, desde una corona de cilios a un manto ciliado, que además cumple un rol fundamental en la alimentación (Ruiz *et al.*, 2008). Todos estos cambios anatómicos y fisiológicos incrementan el gasto energético de la larva en cortos períodos de tiempo, causando que la transición de un estado de trocófora a velígera-D sea un punto crítico en la supervivencia larvaria, a lo que se agrega el efecto sinérgico de aumentos repentinos en la temperatura del mar.

La hipótesis de ajuste-desajuste (Match/mismatch Hypotesis) ha sido ampliamente reportado en larvas y sus efectos han sido asociados a variables ambientales (Durant *et al.*, 2007). Las altas temperaturas pueden generar desacoples entre las microalgas y larvas trocóforas, generando altas mortalidades, producto de inanición. A pesar que en este trabajo no es esperable el efecto anterior, es probable que en la naturaleza la falta de alimento endógeno o exógeno y las variaciones termales sean muy relevantes para larvas de bivalvos que comienzan su alimentación.

Las bajas mortalidades registradas en las larvas velíger umbonada (<10%) se pueden explicar por la presencia de la prosidoconcha I y II, que podrían estar actuando como una estructura de protección frente a las variaciones ambientales, manteniendo a la larva aislada del ambiente (Ruiz *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a lo delgado de sus estructuras, no se puede considerar que las prosidoconchas sean una barrera efectiva en un gradiente térmico. Más bien, la baja mortalidad podría ser consecuencia de un mejor estado de condición fisiológica de las larvas, producto de la alimentación exógena, que les permitiría un mejor desarrollo ontogénico. En esta etapa larval no se presentan cambios anatómicos o fisiológicos importantes, y se caracteriza por el desarrollo y maduración de órganos, no esperándose gastos energéticos importantes que sean críticos en la supervivencia. En larvas velígeras, la regresión del velo de la troca ciliada provoca una reducción de la actividad de natación, pero no de la actividad ciliar (Ruiz *et al.*, 2008), por lo que la adquisición de alimento no sería afectada. Esto reduciría la energía utilizada en natación, posiblemente destinándola al desarrollo de estructuras o a mitigar efectos deletéreos de las variaciones ambientales.

En larvas pre-metamórficas, el 50 y 100% de mortalidad observada a 27 y 30°C respectivamente, se debería a que ambas temperaturas están sobre los rangos de condiciones térmicas extremas para la Bahía Coliumo, considerando que los promedios anuales en el período de 10 años están en el rango de 12-13°C y la temperatura máxima registrada en dicho período fue de 21,3°C. El aumento de mortalidad en larvas pre-metamórficas en comparación a las larvas velíger umbonadas se debería al mayor gasto energético asociado al proceso de metamorfosis que ocurre en el paso de larva pre-metamórfica a juveniles. Previo a la metamorfosis, se debe completar el desarrollo de un complejo sistema de órganos y estructuras (*e.g.*, septos branquiales, tubo digestivo, músculos aductores, órga-

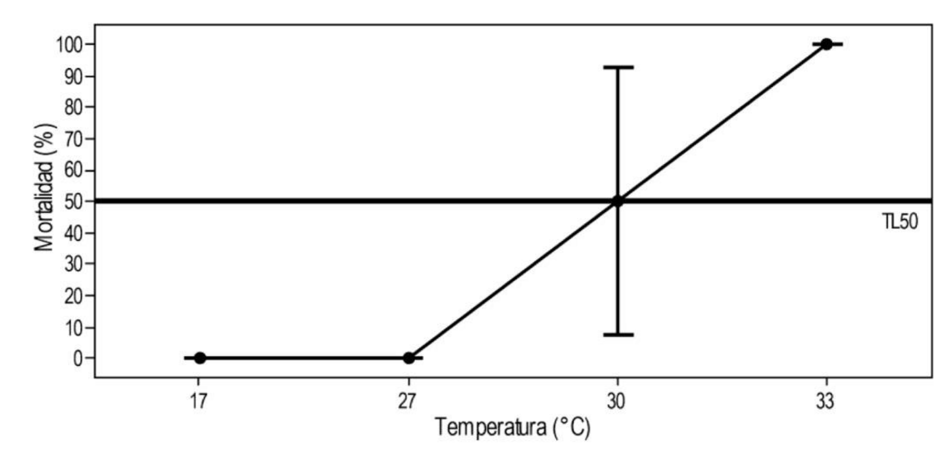


Figura 4. Mortalidad promedio para los adultos de *M. galloprovincialis* provenientes de la temporada cálida, cuando fueron sometidos a cuatro temperaturas diferentes durante 24 h. Las líneas verticales son los intervalos de confianza del 95% para las medias de los tratamientos.

Tabla 3. Análisis de PERMANOVA, con el efecto de la temperatura sobre la mortalidad en adultos de *M. galloprovincialis* provenientes de la temporada cálida (*P* < 0,05). El análisis se construyó en base a medidas de distancia Euclidiana. Suma total de cuadrados (StC) y suma de cuadrados intra-grupo (SCintra).

Permutaciones N: 9999	Medida de distancia Euclidiana			
Adultos temporada cálida				
Mortalidad en 24 h	StC	SCintra	F	*P*
	2,05E+04	22,22	2148	0,0012

no pedal), que requieren de aportes energéticos significativos y cuya disponibilidad dependerá de las condiciones fisiológicas de la larva y de las condiciones ambientales en que ocurre la metamorfosis (Helm *et al.*, 2006). Además, el estrés provocado por las altas temperaturas genera daños estructurales a las proteínas celulares (Dutton & Hofmann, 2009; Tomanek, 2010), provocando que los tejidos no puedan ejercer su rol debido a un impedimento fisiológico. Por otro lado, la desnaturalización de las proteínas activa mecanismos celulares que son demandantes de ATP (HSP) (Hofmann & Somero, 1995; Anestis, 2010; Tomanek & Zuzow, 2010), provocando que las reservas energéticas se agoten antes que el proceso metamórfico se haya completado.

Estado adulto

El efecto letal de las temperaturas >30°C sobre *M. galloprovincialis* es similar a los resultados obtenidos en la almeja *Macoma balthica* y en el mejillón *Mytilus* sp. (Kennedy & Mihursky, 1971; Wallis, 1975) donde para ambas especies, el 50% de mortalidad se alcanzó a las 24 h a 30-31°C, cuando fueron aclimatados a temperaturas de 20-25°C. En el caso de *Choromytilus chorus*, otro mejillón de amplia distribución en la costa chilena y expuesto a un fuerte gradiente térmico. Urban (1994) determinó que las TL_{50} y TL_{100} eran a 26,5 y 28°C, respectivamente, en un período de 24 h de exposición, cuando los mejillones fueron aclimatados previamente a 13°C durante una semana. Asimismo, se indicó que el límite de tolerancia a temperaturas altas de varias especies presentes en la costa chilena sólo variaba en 1,2°C.

Con respecto a ejemplares adultos de *M. galloprovincialis* en el Mar Mediterráneo, Anestis (2007) determinó mortalidades entre 20 y 30% luego de 5 y 30 días, respectivamente, al ser sometidos a 28°C; aumentando la mortalidad solo cuando durante 15 días la temperatura alcanzó 30°C. Al comparar estos resultados con el presente trabajo, se debe considerar que, a pesar que ambos estudios se realizaron en la misma especie frente a un rango similar de temperatura, el tiempo de exposición y principalmente la historia de vida de las poblaciones puede ser responsable de las diferencias observadas.

La baja presencia de filamentos del biso en mitílidos puede ser considerada como una respuesta subletal a condiciones no apropiadas, dado que la secreción de las proteínas polifenólicas del biso requiere un gasto energético de síntesis que deja de ser prioritario en situaciones de estrés fisiológico y de desnaturalización de proteínas. Por otra parte, los individuos responden a este tipo de situaciones cerrando sus valvas, para evitar la exposición al ambiente inadecuado y liberan su biso para soltarse del sustrato rocoso y ser arrastrados por las corrientes marinas a otros ambientes más adecuados. Wallis (1975) determinó en *Mytilus* sp., la presencia de biso irregular y débil durante la aclimata-

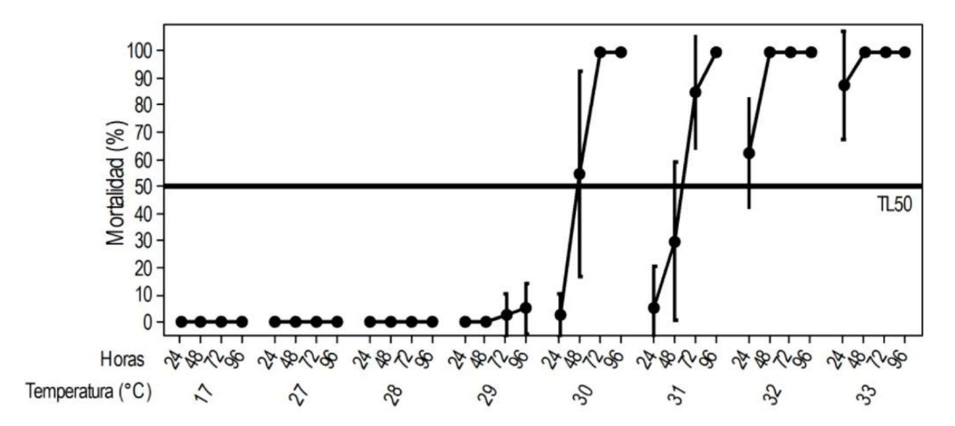


Figura 5. Mortalidad promedio para los mejillones de *M. galloprovincialis* provenientes de la temporada fría, cuando fueron sometidos a ocho temperaturas durante cuatro períodos diferentes de tiempo. Las líneas verticales son los intervalos de confianza del 95% para las medias de los tratamientos.

Tabla 4. Análisis de PERMANOVA de dos factores, con el efecto de la temperatura y tiempo de exposición sobre la mortalidad y presencia de biso en adultos de *M. galloprovincialis* ($P < 0,05$). El análisis se construyó en base a medidas de distancia Euclidiana. Suma de cuadrados (Sc), grados de libertad (gl) y media de cuadrados (Mc).

Permutaciones N: 9999	Medida de distancia Euclidiana					
Estado adulto						
Mortalidad en adultos		Sc	gl	Mc	F	*P*
	Temperatura	2,06E+05	7	29382	600	0,0001
	Horas	19453	3	6484,4	132	0,0001
	Interacción	35322	21	1682	34,4	0,0001
	Residual	4700	96	48,958		
	Total	2,65E+05	127			
Biso en adultos		Sc	gl	Mc	F	*P*
	Temperatura	2,14E+05	7	30507	164	0,0001
	Horas	894,75	3	298,25	1,6	0,1927
	Interacción	2326,5	21	110,79	0,6	0,8925
	Residual	17850	96	185,94		
	Total	2,35E+05	127			

ción a 25°C, al compararse con mejillones que estaban a 20°C. La ausencia de biso se correlacionó positivamente con la mortalidad, siendo mayor a 25°C que a otras temperaturas. Adicionalmente, en el trabajo de Van Winkle (1970) se encontró que el principal factor estresante, que afectó a la formación de biso en *M. edulis*, fue precisamente la temperatura. En el presente trabajo se observó una respuesta similar a las anteriormente descritas. A 27°C el 100% de los mejillones presentaron biso, pero disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de exposición y la temperatura, observándose un 65% de ejemplares con biso después de 96 h; coincidiendo la ausencia de biso con el 55% de mortalidad de mejillones, luego de 48 h a 30°C.

La historia térmica en el ambiente natural y actual de los organismos es un factor clave en las diferencias encontradas en los límites superiores de tolerancia termal dentro de una especie (Hochachka & Somero, 2002; Pörter, 2002). Bayne (1976) encontró que la adaptabilidad de los organismos ante cualquier cambio ambiental es producto de diversos mecanismos determinados por series de adaptaciones genéticas efectuadas en la historia de vida de las poblaciones. Por esto que se espera que mejillones con una distribución natural en zonas de alta temperatura del mar presenten mayor tolerancia termal (Pörter, 2002; Lockwood & Somero, 2011). Por lo tanto, esto indicaría que el límite superior de tolerancia termal no es fijo dentro de una especie; sino que es propio de las poblaciones (Helmuth, 2002).

La población de *M. galloprovincialis*, presente en la costa central de Chile, se encuentra expuesta a temperaturas cálidas en verano, que fluctúan entre 15 y 16°C, y que eventualmente cada verano alcanza los 18°C. Sin

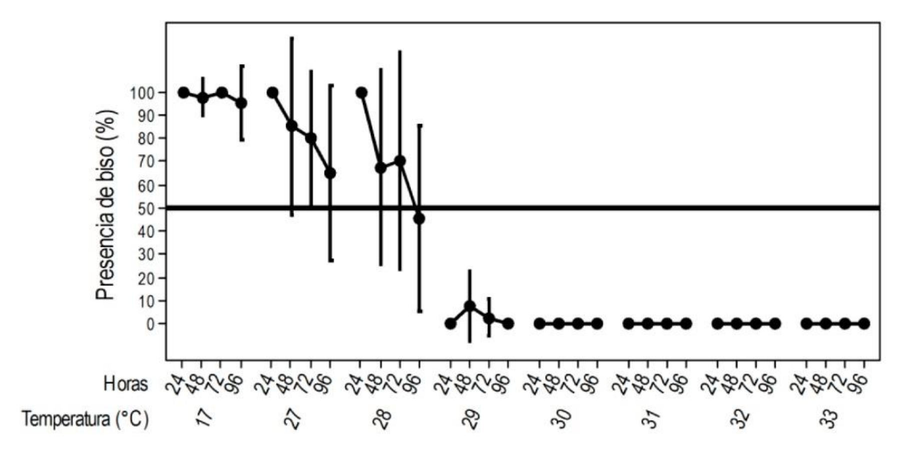


Figura 6. Presencia de biso promedio para los adultos de *M. galloprovincialis*, cuando fueron sometidos a ocho temperaturas durante cuatro períodos. Las líneas verticales son los intervalos de confianza del 95% para las medias de los tratamientos.

embargo, experimentalmente se demostró que pueden soportar temperaturas hasta de 28°C durante cuatro días, sin presentar mortalidades, lo que significa un rango de seguridad frente a eventuales procesos oceanográficos de aumentos repentinos de las temperaturas, como los observados durante eventos El Niño (Urban, 1994). La tolerancia térmica demostrada por esta especie sugiere que sus poblaciones naturales podrían extenderse a latitudes menores de 36°S, lo que explica la eventual presencia de ejemplares fijados en sistemas de cultivos de ostiones (*A. purpuratus*) en la bahía de Tongoy (30°25'S; 71º50'W; Tarifeño *et al.*, 2012). En el extremo norte de Chile (Arica, 18°S), el promedio anual de temperatura máxima es de ~25°C, que es cercano al límite máximo de tolerancia termal de *M. galloprovincialis*, lo que pone en duda la presencia de esta especie a esa latitud. Considerando que *M. galloprovincialis* es una especie de aguas cálidas, la cita realizada por Lancelloti & Vásquez (2000) de presencia del congénere de aguas frías *Mytilus chilensis*, "chorito chileno", en la costa de Arica debe ser ratificada molecularmente.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento al personal de laboratorio y terreno de la Unidad Productora de Semillas, de la Universidad de Concepción. Al personal de la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción, especialmente a José Marileo por su ayuda en este trabajo. Además, agradecemos los valiosos aportes de los revisores, que permitieron mejorar este escrito. El financiamiento para la ejecución del presente estudio fue provisto por el Proyecto FONDEF D03I-1095 e INNOVA-CORFO 10CRE8535, desarrollado por el Grupo ProMytilus de la Universidad de Concepción.

REFERENCIAS

Anestis, A., A. Lazou, H. Pörter & B. Michaelidis. 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. Am. Physiol. Soc., 293: 911-921.

Anestis, A., H.O. Pörtner, D. Karagiannis, P. Angelidis, A. Staikou & B. Michaelidis. 2010. Response of *Mytilus galloprovincialis* (L.) to increasing seawater temperature and to marteliosis: metabolic and physiological parameters. Comp. Biochem. Physiol. A., 156: 57-66.

Anderson, M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Aust. Ecol., 26: 32-46.

Bayne, B. 1976. Marine mussels, their ecology, and physiology. Cambridge University Press, London, 506 pp.

Braby, C. & G. Somero. 2006. Ecological gradients and relative abundance of native *(Mytilus trossulus*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) blue mussels in the California hybrid zone. Mar. Biol., 148: 1249-1262.

Branch, G. & C. Steffani. 2004. Can we predict the effects of alien species? A case history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 300: 189-215.

Cárcamo, C., A. Comesaña, F. Winkler & A.M. Sanjuan. 2005. Allozyme identification of mussel (Bivalvia,

Mytilidae) on the Pacific coast of South America. J. Shellfish Res., 24: 1101-1115.

Cole, V. & C. McQuaid. 2010. Bioengineers and their associated fauna respond differently to the effects of biogeography and upwelling. Ecology, 91: 3549-3562.

Drinkwater, K.F., G. Beaugrand, M. Kaeriyama, S. Kim, G. Ottersen, R.I. Perry, H.O. Pörtner, J.J. Polovina & A. Takasuka. 2010. On the processes linking climate to ecosystem changes. J. Mar. Syst., 79: 374-388.

Durant, J.M., D. Hjermann, G. Ottersen & N.C. Stenseth. 2007. Climate and the match or mismatch between predator requirements and resource availability. Clim. Res., 33: 271-283.

Dutton, J.M. & G.E. Hofmann. 2009. Biogeographic variation in *Mytilus galloprovincialis* heat shock gene expression across the eastern Pacific range. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 376: 37-42.

Hammer, Ø., D.A.T. Harper & P.D. Ryan. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron., 4(1): 9 pp.

Helm, M., N. Bourne & A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Doc. Téc. Pesca, 471: 184 pp.

Helmuth, B. 2002. How do we measure the environment? Linking intertidal thermal physiology and ecology through biophysics. Integr. Comp. Biol., 42: 837-845.

Hicks, D.W. & R.F. McMahon. 2002. Temperature acclimation of upper and lower thermal limits and freeze resistance in the non-indigenous brown mussel, *Perna perna* (L.), from the Gulf of Mexico. Mar. Biol., 140: 1167-1179.

Hochachka, P.W. & G.N. Somero. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York, 466 pp.

Hofmann, G.E. & G.N. Somero. 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and HSP70 in the intertidal mussel *Mytilus*. J. Exp. Biol., 198: 1509-1518.

Jansen, J., A. Pronke, S. Kube, A. Sokolowski, J. Sola, M. Marquiegui, D. Schiedek, S. Bonga, M. Wolowicz & H. Hummel. 2007. Geographic and seasonal patterns and limits on the adaptive response to temperature of European *Mytilus* spp. and *Macoma balthica* populations. Oecologia, 154: 23-34.

Kennedy, V.S. & J.A. Mihursky.1971. Upper temperature tolerances of some estuarine bivalves. Chesapeake Sci., 12: 193-204.

Lancelloti, D. & J. Vásquez. 2000. Zoogeografía de macroinvertebrados bentónicos de la costa de Chile: contribución para la conservación marina. Rev. Chil. Hist. Nat., 73: 99-129.

Lee, J. & S. Chow. 2007. *Mytilus* on the move: transport of an invasive bivalve to the Antarctic. Mar. Ecol. Prog. Ser., 339: 307-310.

Lockwood, B.L. & G.N. Somero. 2011. Invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) on the California coast: the role of physiology in a biological invasion. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 400: 167-174.

Maturana, J., M. Bello & M. Manley. 2004. Antecedentes históricos y descripción del fenómeno El Niño, Oscilación del Sur. In: S. Avaria, J. Carrasco, J. Rutllant & E. Yáñez (eds.). El Niño-La Niña 1997-2000. Sus efectos en Chile. CONA, Valparaíso, pp. 13-27.

Newell, R. 1976. Adaptation to environment: essays on the physiology of marine animals. Butterworths, London, pp. 480-150.

Pörtner, H.O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comp. Biochem. Physiol. A, 132: 739-761.

Programa de información de especies acuáticas. *Mytilus galloprovincialis*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de A. Figueras Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO Roma. Actualizado 1 Enero 2004. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_-galloprovincialis/es. Revisado: 2 Diciembre 2013.

Ruiz, M., E. Tarifeño, A. Llanos-Rivera, C. Padget & B. Campos. 2008. Temperature effect in the embryonic and larval development of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 43(1): 51-61.

Sanjuán, A., C. Zapata & G. Álvarez. 1997. Genetic differentiation in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. throughout the world. Ophelia, 47(1): 13-31.

Sicard, M.T., A.N. Maeda-Martinez, S.E. Lluch-Cota, C. Lodeiros, L.M. Roldan-Carrillo & R. Mendoza-Alfaro. 2006. Frequent monitoring of temperature: an essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. Aquacult. Res., 37: 1040-1049.

Suchanek, T., J. Geller, B. Kreiser & J. Mitton. 1997. Zoogeographic distribution of the sibling species *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) and their hybrids in the North Pacific. Biol. Bull., 193: 187-194.

Tarifeño, E., M. Carmona, A. Llanos-Rivera & L. Castro. 2008. Temperature effects on the anchoveta *Engraulis ringens* eggs development: do latitudinal occur? Environ. Biol. Fish., 81: 387-395.

Tarifeño, E., R. Galleguillos, A. Llanos-Rivera, D. Arriagada, S. Ferrada, B. Canales-Aguirre & M. Seguel. 2012. Erroneous identification of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) as the specie, *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) in the Bay of Concepcion, Chile. Gayana, 76(2): 167-172.

Tomanek, L. 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. J. Exp. Biol., 213: 971-979.

Tomanek, L. & M. Zuzow. 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. J. Exp. Biol., 213: 3559-3574.

Toro, J., J. Ojeda, A. Vergara, G. Castro & A. Alcalán. 2005. Molecular characterization of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. J. Shellfish Res., 24(4): 1117-1122.

Urban, J. 1994. Upper temperature tolerance of ten bivalve species off Peru and Chile related to El Niño. Mar. Ecol. Prog. Ser., 107: 139-145.

Van Winkle, W. 1970. Effect of environmental factors on byssal thread formation. Mar. Biol., 7: 143-148.

Wallis, R. 1975. Termal tolerance of *Mytilus edulis* of eastern Australia. Mar. Biol., 30: 183-191.

Received: 16 March 2014; Accepted 7 January 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 484-494, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-10

Research Article

Descripción histológica comparativa del desarrollo del sistema digestivo y visual de larvas de chame *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae)

Vanesa V. López-López[1], Gustavo A. Rodríguez M. de O.[1], Mario A. Galavíz[2] Cristóbal Román Reyes[1], Eva A. Medina-Hernández[1], Konrad Dabrowski[3] & María C. Haws[4]
[1]Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México
[2]Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California
Ensenada, Baja California, México
[3]School of Environment and Natural Resources, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA
[4]Pacific Aquaculture and Coastal Resources Center, University of Hawaii-Hilo, Hawaii, USA
Corresponding author: Gustavo A. Rodríguez M. de O. (grodriguez@uas.edu.mx)

RESUMEN. Se realizó la descripción del desarrollo de larvas de uno a seis días post-eclosión (dpe), para generar información que ayude a comprender la capacidad alimenticia en etapas tempranas. Las larvas se obtuvieron mediante la inducción hormonal de reproductores, utilizando implantes de análogos sintéticos de GnRH durante la temporada de septiembre-noviembre de 2010. Las muestras fueron incluídas en historesina y teñidas con hematoxilina-eosina. Una vez eclosionada, la larva presenta gran cantidad de vitelo que absorbe gradualmente (1º a 3º dpe). Al 4º dpe, existe una cavidad bucal abierta con estructuras dentales, en este estadio se ha completado el desarrollo ocular, que presenta pigmentación. Se observa la formación de las hendiduras branquiales y se diferencia el intestino en anterior y posterior y se distingue la presencia de vacuolas digestivas en el intestino anterior. En el 5º dpe, se observaron los paquetes de fibras musculares y se distinguió una estructura estomacal. En el 6º dpe, el páncreas, pliegues intestinales y membrana de borde de cepillo son visibles y se observaron partículas de alimento y bacterias dentro del intestino. En base a lo anterior, se concluye que las larvas de *D. latifrons* han desarrollado completamente el tracto digestivo y órganos asociados que le ayudarán a la búsqueda de alimento, entonces a partir del 4º dpe son capaces de iniciar la alimentación exógena.

Palabras clave: *Dormitator latifrons*, chame, larvas, ontogenia, sistema digestivo, acuicultura, México.

Comparative histological description of the digestive and visual system development of larval chame *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae)

ABSTRACT. This study was focused on the morphological description of chame larvae from one to six days post-hatching (dph), in order to generate information that helps understanding their feeding ability in early stages. The larvae were obtained by hormonal induction of a broodstock, using implants of GnRH synthetic analogues, during the spawning season from September to November 2010. The samples were included in historesin, and stained with hematoxylin-eosin. It was described that, once the larva hatched has a large amount of yolk it is gradually absorbed (from 1 to 3 dph). At day four, there is an open oral cavity with dental structures, the eye development is complete and there was pigmentation on it, the gills are observable and the foregut was differentiated in anterior and posterior intestine, showing the presence of digestive vacuoles in the anterior intestine. By five dph the larvae has developed muscle fibers and a structure identified as the stomach. At sixth dph, it is possible to identify the pancreas, the intestinal folds, and the brush border membrane, and there were food particles and bacteria rests in the gut. Based on the above, it is concluded that the larvae of *D. latifrons* from the fourth dph fully developed organs and systems that help the search of food, so they are capable of starting with exogenous feeding.

Keywords: *Dormitator latifrons*, chame, larvae, ontogeny, digestive system, aquaculture, Mexico.

Corresponding editor: Guido Plaza

INTRODUCCIÓN

La necesidad de expandir el número de especies de peces para acuicultura es de alta relevancia dada la contribución mundial de la acuicultura a la producción de organismos acuáticos. El chame *Dormitator. latifrons* es una especie con varias características deseables como su tolerancia a variaciones de sali-

nidad, temperatura y oxígeno disuelto, además de ser resistente a la manipulación, lo que lo hace una excelente opción para la acuicultura (Bonifáz *et al*., 1985). En algunos estados del sur y sureste de México, es utilizado para consumo humano y como carnada (Reséndez, 1973; Larumbe, 2002). En Ecuador tiene grandes expectativas de comercialización y representa una fuente alternativa de empleo (Navarro-Rodríguez *et al*., 2004; Castro-Rivera *et al*., 2005). Sin embargo, para desarrollar su cultivo es necesario producir una cantidad suficiente de larvas y lograr su desarrollo hasta el momento de la siembra de juveniles. Los esfuerzos de investigación en Ecuador y México en los últimos 20 años se han enfocado a determinar las condiciones que logren la supervivencia y crecimiento de larvas para plantear una o varias estrategias de alimentación larvaria y generar los juveniles en masa de chame necesarios para la expansión de su cultivo de forma similar al conocimiento generado para otros peces, principalmente larvas de peces marinos (Ueberschär, 1988).

Un aspecto importante en el crecimiento larvario, una vez que se está efectuando la transición de alimentación endógena a exógena, es el desarrollo del tracto digestivo, que le permitirá a la larva el aprovechamiento del alimento para su crecimiento. Para realizar con eficiencia estos cambios, las larvas deben estar capacitadas para ingerir y utilizar el alimento. No obstante, en la mayoría de las especies, el sistema digestivo de las larvas es morfológica, histológica y fisiológicamente menos desarrollado que el de los adultos (Govoni *et al*., 1986). Por lo tanto, la capacidad de las larvas para digerir algunos componentes lipídicos y proteicos de las dietas no está claramente definida, ya que de inicio las larvas de peces no tienen bien desarrollado su sistema digestivo y su capacidad para secretar enzimas digestivas, que ayuden a la digestión de los nutrientes, no está bien definida en muchas especies, incluyendo el chame (Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Rivera & Botero, 2009). La diferenciación del tracto digestivo en las larvas de peces es una parte crucial para el inicio de la alimentación exógena (O´Connell, 1981), por lo que es importante identificar el estado de desarrollo morfológico en que se encuentra al inicio de la alimentación exógena. Asimismo, la interacción de los peces con su medio ambiente se relaciona directamente con sus órganos de los sentidos (Sandstrom, 1999) y el comienzo de la alimentación exógena en las larvas de peces requiere el desarrollo simultáneo de los órganos y sistemas relacionados con la búsqueda de las presas para la ingesta, es decir, los sistemas visual y digestivo (Peña *et al.*, 2003). Existen diferencias notables en el grado de desarrollo del ojo en peces de agua dulce, ya que por lo general este órgano está mucho más desarrollado al momento de la eclosión comparado con las larvas de peces de ambientes marinos (Fuiman & Magurran, 1994). Por ejemplo, en el besugo *Pagrus pagrus* no se observa un sistema visual funcional al momento de la eclosión, pero el desarrollo de esta estructura coincide con el progreso de la funcionalidad del tracto digestivo, ya que al igual que en otras larvas de peces, la alimentación es un proceso visual en cuanto a la localización e ingesta de la presa (Roo *et al*., 1999), siendo de alta relevancia que tanto el sistema digestivo como el ojo presenten cierto grado de desarrollo al inicio de la alimentación exógena (Govoni *et al*., 1986).

El conocimiento de la morfología y funcionalidad del tracto digestivo en larvas de peces, es muy relevante ya que de esta forma se establecen indicios sobre la factibilidad de ofrecer alimento, ya sea vivo o inerte, para lograr el inicio de la alimentación exógena (Gisbert *et al*., 2004). Una de las herramientas disponibles para este fin son los estudios a nivel histológico para describir el desarrollo temprano de los órganos y arreglos celulares que se presentan en los primeros días de vida de un pez, durante y posteriormente a la absorción del saco vitelino (Sanchez-Amaya *et al*., 2007). Una vez establecido lo anterior, es viable establecer comparaciones con otros peces y hacer conclusiones preliminares sobre el posible camino a seguir en cuanto a establecer un esquema de alimentación adecuado para lograr el larvicultivo de un pez en particular (Kolkovski, 2001). Como trabajo previo con chame se han realizado estudios donde se ha comprobado que el uso de análogos sintéticos de GnRH y LHRH son una herramienta útil en la reproducción de *D. latifrons* al obtener gametos viables (Rodríguez-Montes de Oca *et al.*, 2011), además, en experimentos realizados con larvas *in vivo* se ha observado actividad mandibular a partir del tercer día post-eclosión dpe (Rodríguez-Montes de Oca *et al.*, 2012). Es importante señalar que el chame es un pez agástrico; este es un hecho esencial ya que de acuerdo a lo señalado por Liu *et al*. (2013), la mayoría de este tipo de trabajos están enfocados a la descripción del desarrollo temprano de peces que eventualmente presentan un estómago funcional, hecho que posteriormente favorece la transición del uso de alimento vivo a dietas artificiales en un menor tiempo. Por lo tanto, para contribuir al conocimiento de la especie, en el presente trabajo, se realizó la descripción morfológica del estado de desarrollo del sistema digestivo y visual de las larvas de *D. latifrons* durante los primeros 6 dpe y así generar información requerida para establecer si las larvas cuentan con órganos u otras estructuras asociadas para la captura y procesamiento del alimento al inicio de la alimentación exógena y

contribuir al desarrollo de protocolos de alimentación para garantizar la supervivencia larval, dado que hasta este momento no existe información al respecto y no se ha logrado la producción de larvas de chame en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las larvas

Para el análisis histológico, se utilizaron larvas de *D. latifrons* obtenidas de un stock de reproductores mantenido en cautiverio durante 1 a 2 años en las instalaciones de la Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR-UAS, Mazatlán Sinaloa, México). Los reproductores se indujeron al desove mediante la utilización de implantes de análogos sintéticos de GnRH a una concentración de 75 µg por hembra (Ovaplant, Syndel, Canadá) en la temporada 2010 (septiembre-noviembre). Posteriormente, se extrajeron los gametos, se realizó la fertilización artificial y se distribuyeron los huevos en contenedores plásticos transparentes de 1 L con agua filtrada (3 µm y filtro UV), aireación y temperatura constantes (26°C). Una vez eclosionadas, las larvas fueron reubicadas en tanques de 3 L a una densidad de 50 larvas L^{-1} y se alimentaron con una combinación de las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. y el probiótico Epicin (Epicore Bionetworks Inc. EUA) (Medina-Hernández, 2012), colectando larvas de 1, 2, 4, 5 y 6 dpe para su posterior análisis histológico.

Fijación

Las larvas se extrajeron de los tanques de alimentación filtrando un volumen de 100-150 mL por contenedor con un tamiz de 100 µm y se colocaron en 1,5 mL de solución de paraformaldehido al 4% en un vial de polietileno Eppendorff, se refrigeraron en esta solución y finalmente se les cambió a solución amortiguadora de Sorensen como conservador previo para su envío a Ohio State University, School of Environment and Natural Resources, en Columbus, Ohio, USA.

Para la inclusión de las muestras se prepararon 200 mL de resina (monómero de glicol metacrilato), se añadieron dos sobres de catalizador (un sobre de peróxido de benzoico por cada 100 mL) y se introdujo un agitador magnético. El vaso de precipitado que contenía la mezcla se colocó sobre una cápsula de Petri con hielo y finalmente se agitó, con ayuda de un plato agitador a temperatura ambiente. Una vez mezclada la resina se procedió a separarla en contenedores de cristal transparente marcados como: Alcohol+Resina (1:1, alcohol 95%, resina recién preparada), Resina I, Resina II, y Resina para inclusión y se mantuvieron refrigeradas. Una vez preparado lo anterior se siguió el procedimiento indicado en la Tabla 1.

Tabla 1. Procedimiento de inclusión de las muestras en historesina.

Reactivo	Tiempo
Alcohol 80%	1 h
Alcohol 95%	3 h
Alcohol + resina 1:1	4 h
Resina I (pura)	4 h o toda la noche
Resina II (pura)	4 h

Preparación de los moldes y cortes de los bloques

Para preparar los bloques se utilizó la resina de inclusión a la cual se agregó endurecedor (derivado de ácido barbitúrico), a razón de 1 mL por cada 15 mL de resina a temperatura ambiente. Para la fabricación de los bloques se utilizaron moldes de silicón de 7x14x4 mm de profundidad, los cuales, con un estereoscopio fueron parcialmente rellenados con resina, se colocaron 3 larvas en posición dorso-lateral por molde y se continuó con el llenado del mismo. Una vez realizado el procedimiento se marcaron las muestras y se colocaron en una estufa Thelco 11467 a 37°C durante 12 h.

Una vez obtenidos los bloques con las muestras se efectuaron los cortes histológicos, utilizando un micrótomo automático Leica, modelo RM2265 con cuchillas de cristal. Se realizaron cortes longitudinales y transversales de 3 µ de grosor y se colocaron en portaobjetos con agua destilada previamente etiquetados, una vez extendido el corte, se extrajo el exceso de agua y se colocaron sobre una plancha caliente (~30°C) por unos segundos para evaporar el agua, finalmente, se retiraron del calor y se dejaron secar por 24 h antes de agregar la tinción.

Tinción y toma de imágenes digitales

Para la tinción de los cortes se utilizó el método de hematoxilina-eosina (hematoxilina I Cardinal Health® lista para usarse y eosina base agua al 2,5%). Se colocaron las láminas en contenedores de cristal con tapa y se tiñeron como se indica en la Tabla 2.

Finalmente, las láminas se dejaron secar durante 4-5 h, se montaron con Permount (Fisher Scientific® mounting medium) y se dejaron secar durante 24 h para su posterior análisis al microscopio y toma de fotografías con un microscopio compuesto (Amscope, modelo 109126) 100x y 400x de magnificación. Para la captura de imágenes digitales se utilizó el programa Motic Images Plus 2.0.

Tabla 2. Protocolo de tinción hematoxilina-eosina.

Reactivo	Tiempo
Agua corriente	5 min
Hematoxilina	3 min
Agua corriente	Lavado rápido
Eosina	2 min
Agua corriente	Lavado rápido

RESULTADOS

Desarrollo del sistema digestivo

Al momento de la eclosión las larvas del chame presentan un tracto digestivo sencillo en forma de tubo con células indiferencias que descansa dorsalmente sobre el saco vitelino, que se encuentra cerrado al exterior (boca y ano) (Fig. 1a) y una aleta dorsal primitiva (Fig. 1b). A 2 dpe, la larva presentó cambios significativos en la maduración de órganos involucrados en la digestión del alimento como esófago e intestino, pues se apreció la formación de un canal donde el día anterior solo se observaba el saco vitelino y se distingue el giro o circunvolución característico que originará la división que formará la región posterior y anterior del intestino. Además, se observó una abertura que corresponde al inicio de la apertura de la boca y se dirige (de derecha a izquierda) hacia la región que formará el canal bucofaríngeo que se identifica como la cavidad bucal de la larva y aún se encuentra presente el saco vitelino. La boca y ano no están desarrollados por completo, lo que indica que la larva aún no está preparada para su alimentación exógena (Fig. 2a). La absorción del saco vitelino ocurrió entre el 3º y 4º dpe, observándose cambios importantes en el sistema digestivo de las larvas. El lumen intestinal es visible, con pliegues intestinales rudimentarios en su interior y en la capa más externa del mismo, que presenta proyecciones (borde de cepillo) y células epiteliales ciliadas con núcleos basales definidos y vacuolas supranucelares en desarrollo. Adicionalmente, se observa la formación del ducto urinario y aparentemente, el grupo de células que podrían formar la vejiga natatoria, intestino, hígado 4º dpe. Así mismo, fueron visibles las células basófilas del páncreas exocrino difuso, órgano importante, que será el principal secretor de enzimas digestivas (Fig. 2b).

Las larvas muestran la ingestión de partículas de las dietas ofrecidas a partir del 4 dpe (Fig. 3b), además que el 100% de las larvas tenía la boca abierta y funcional. Al 5º y 6º dpe (Figs. 4a, 4b), se observó el esófago bien desarrollado y se distinguió un abultamiento en el intestino anterior, como una extensión del esófago. El hígado continuó desarrollándose e incrementando su tamaño. También se determinaron células exocrinas del páncreas embebidas entre los diferentes órganos; otras estructuras visibles al 5º y 6º dpe son el conducto urinario relacionado con el ano, riñón embrionario (pronefros) y corazón. Las glándulas gástricas no fueron identificadas en las larvas procesadas hasta en el 6º dpe y se observó una extensión del esófago indicando la formación de saco, en posición anterior al intestino. En esta misma etapa se observó la aparición de células de la mucosa del esófago que posteriormente incrementan en número, como también el aumento en el tamaño del hígado (Fig. 4b).

Desarrollo del sistema visual

Al momento de la eclosión (1º dpe), la retina de las larvas fue indiferenciada. El lente empieza a desarrollarse cuando se observan paquetes celulares que formarán el tejido ocular. La retina se encuentra rodeada por la esclerótica, compuesta por células no diferenciadas en disposición concéntrica, sin estratificación evidente en esta etapa del desarrollo (Fig. 5a).

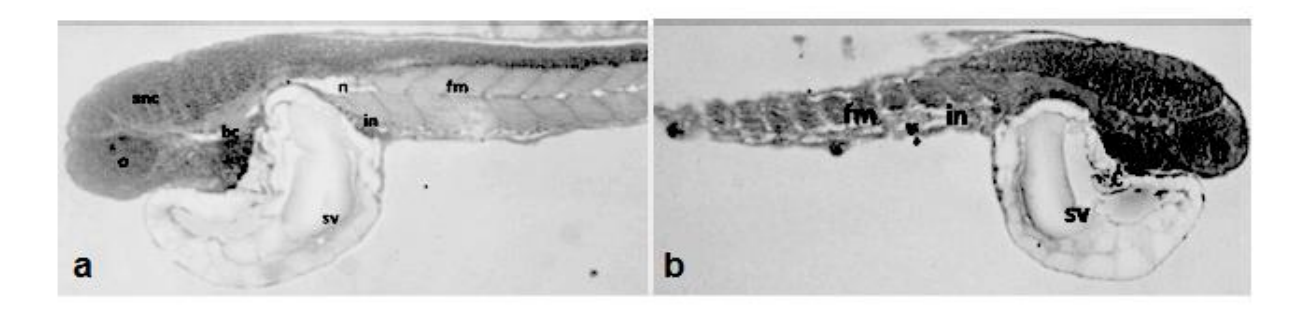


Figura 1. Corte longitudinal de larvas de chame. a) 1dpe, b) 2 dpe, (20x). bc: canal bucofaríngeo, c: corazón, fm: fibras musculares, in: intestino primordial, n: notocordio, o: ojo, snc: sistema nervioso central, sv: saco vitelino. Tinción hematoxilina-eosina.

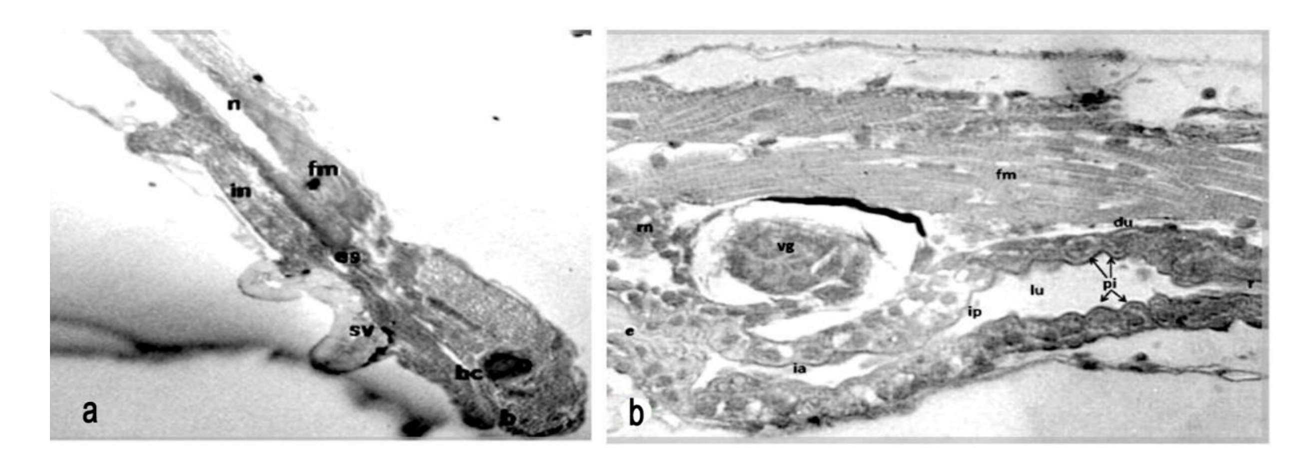


Figura 2. Corte longitudinal de larvas de chame. a) 2 dpe (20x), b) 4 dpe (40x). a. ano, b: boca, bc: canal bucofaríngeo, du: ducto urinario, es: esófago, fm: fibras musculares, ia: intestino anterior, in: intestino, ip: intestino posterior, lu: lumen, o: ojo, pi: pliegues intestinales rudimentarios, r: recto, rn: riñón cefálico, sv: saco vitelino, vg, vejiga gaseosa. Tinción hematoxilina-eosina.

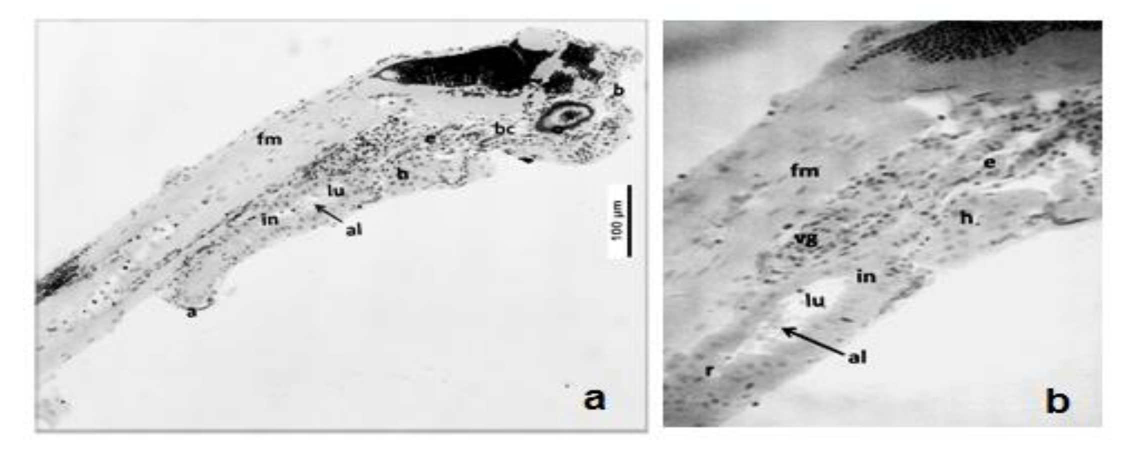


Figura 3. Corte longitudinal de larvas de chame de 4 dpe (40x). a) Larva completa de chame, b) sistema digestivo de larvas de chame. a: ano, al: residuos de alimento, b: boca, bc: bucofaríngeo, e: esófago, h: hígado, vg: vejiga gaseosa. Tinción hematoxilina-eosina.

A partir del 2º dpe, se observó un avance notable en el desarrollo visual del organismo, como algunos cambios en la estratificación de la retina que originaron cinco capas retinianas, nombradas de la parte más interna a la externa como: capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa plexiforme externa, algunas células fotorreceptoras y finalmente, la formación de los segmentos externos de los conos (Fig. 5b). La capa nuclear interna consistió en una hilera de segmentos nucleares de los conos individuales en desarrollo, las capas plexiformes consistes en las dendritas de las neuronas situadas en las capas interiores del núcleo celular y del ganglio, y la capa de células ganglionares compuesta de varias hileras de células redondas. Durante los siguientes días (3º y 4º dpe), el sistema visual de las larvas continuó su desarrollo hasta llegar a su total maduración al 5º dpe y es posible identificar con precisión las diferentes capas que conforman una retina bien desarrollada, tales como el lente, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, plexiforme externa y epitelio pigmentado (Fig. 6).

DISCUSIÓN

Existen numerosas investigaciones sobre el desarrollo larvario de peces, que incluyen observaciones de la ontogenia temprana, histomor-fología y cuantificación de macromoléculas proteicas, lipídicas y enzimáticas (Cousin *et al.*, 1986; Vazquez *et al.*, 1994; Moyano *et al.*, 1996). Las primeras semanas de desarrollo son un

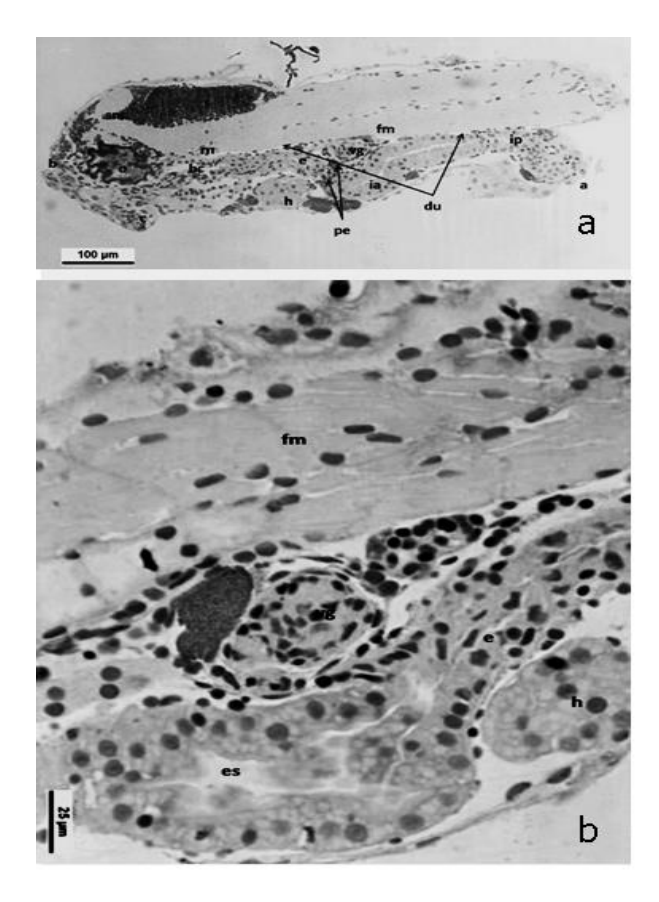


Figura 4. Cortes longitudinales de larvas de chame. a) 5 dpe, b) 6 dpe. a: ano, b: boca, bc: conducto bucofaríngeo, c: corazón, du: ductos urinarios, e: esófago, es: bolsa pseudoestomacal, fm: fibras musculares, h: hígado, ia: intestino anterior, ip: intestino posterior, o: ojo, pe: páncreas exocrino, rn: riñón embrionario, vg: vejiga gaseosa. Tinción hematoxilina-eosina.

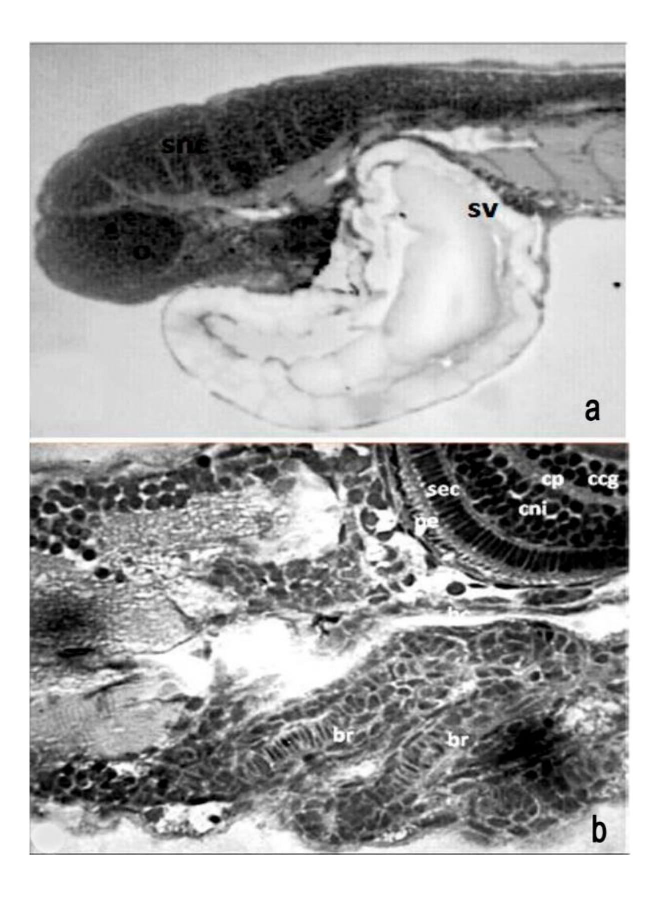


Figura 5. Cortes longitudinales de larvas de chame. a) 1 dpe, b) acercamiento del corte longitudinal de la cabeza de una larva 2 dpe (100x). bc: conducto bucofaríngeo, br: branquia, pe: capa de epitelio pigmentado, sec: segmentos externos, cni: capa nuclear interna, cp: capa plexiforme interna, ccg: capa de células ganglionares, cne: capa nuclear externa, sv: saco vitelino, snc: sistema nervioso central, o: ojo presuntivo. Tinción hematoxilina-eosina.

periodo crítico para las larvas de peces, particularmente cuando termina la fase lecitotrófica y comienza la alimentación exógena, ya que se presentan limitaciones morfológicas, como el desarrollo y tamaño de la boca y limitaciones fisiológicas como el desarrollo completo del intestino, páncreas, hígado y estómago, ya que mientras estos órganos no estén bien desarrollados y sean funcionales, pueden existir restricciones en el tipo de alimento que las larvas pueden utilizar (García-Gasca *et al*., 2006, Galaviz *et al*., 2011).

El presente estudio aporta una descripción comparativa a nivel histológico del desarrollo temprano de larvas de chame, desde la eclosión hasta el 6º dpe, enfocado al sistema digestivo y visual, destacando que no existe información publicada previamente al respecto. En primera instancia, los resultados presentados describen la morfología de la larva de chame durante la etapa endotrófica y el inicio a la fase endoexotrófica. El chame es un pez sin estómago, por lo que dicha descripción contribuye al conocimiento del desarrollo temprano en peces agástricos. De acuerdo con Dabrowski (1982), se establecen tres categorías de peces considerando los principales eventos que ocurren durante la evolución y desarrollo de su sistema digestivo. En el primer grupo se incluye los peces que al inicio de la alimentación exógena presentan un estómago bien desarrollado y funcional. En el segundo grupo, se encuentra la mayoría de los peces marinos, en los cuales el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena (Lauff & Hoffer, 1984). En el tercer grupo, se incluye los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida, siendo lo más común durante su desarrollo larvario el incremento de la longitud del intestino, por lo cual el chame entra en esta última categoría.

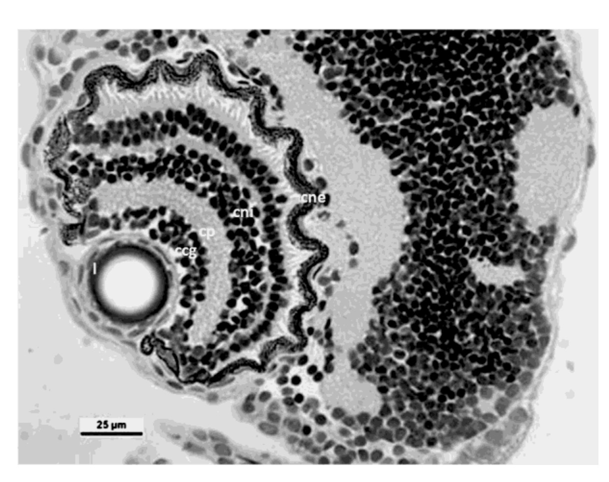


Figura 6. Larva de cinco días post-eclosión. ccg: capa de células ganglionares, cne: capa nuclear externa, cni: capa nuclear interna, cp: capa plexiforme interna, I: iris. Tinción hematoxilina-eosina.

Como dato inicial se destaca que las larvas de *D. latifrons* miden 1,0-1,3 mm al eclosionar (Rodríguez-Montes de Oca *et al*., 2012), de forma similar a su equivalente ecológico en el Océano Atlántico, la naca *D. maculatus* (1 mm) (Flores-Coto & Zavala-García, 1982), lo cual da una idea del mínimo desarrollo de órganos y otras estructuras. Al momento de la eclosión, las larvas del chame no presentan boca ni ano abierto y tampoco se observaron ojos diferenciados. Además, presenta una gran masa de saco vitelino con una línea de células indiferenciadas que formarán el tubo digestivo, coincidiendo con otros peces como el bagre amarillo *Pelteobagrus fulvidraco* (Yang *et al*., 2010), el halibut *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004) y el dentón común *Dentex dentex* (Santamaría *et al*., 2004) por mencionar algunos. Ante dichas comparaciones, el chame entra en la categoría de peces que tienen un desarrollo indirecto ya que proviene de huevos pequeños y transparentes, similar a algunos peces marinos, que de igual forma presentan larvas transparentes y que como características generales carecen de hemoglobina, tracto intestinal simple, esbozo del hígado, páncreas, vesícula biliar y vaso, riñones protonéfricos y otras estructuras de importancia durante su desarrollo, la pigmentación no es muy evidente y se puede observar la formación de paquetes celulares que darán forma al sistema visual.

Durante la absorción del saco vitelino muchas de las estructuras mencionadas arriba se diferencian y desarrollan su funcionalidad. La velocidad de estos eventos se debe a factores genéticos y ambientales (Falk-Petersen, 2005). Una diferencia entre el chame y otros peces, es que las reservas del saco vitelino son utilizadas en un corto periodo de tiempo, dado que ya no se observa al 3º dpe, donde a diferencia de otros peces como la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*, se ha reportado que existe una fase de alimentación combinada (Peña *et al*., 2013).

Es importante considerar que para que un pez logre exitósamente la transición de alimentación endógena a exógena, debe tener estructuras funcionales asociadas a la alimentación (Yúfera & Darias, 2007). El hecho que el chame no presente un estómago en la fase de juvenil y adulto, da pauta a una de las principales diferencias funcionales de la actividad digestiva en sus larvas. En algunos peces marinos como el bagre amarillo al 3º dpe comienza gradualmente la función digestiva con mayor funcionalidad (Yang *et al*., 2010). También existen otros peces, con un patrón de desarrollo muy similar al chame, donde los juveniles y adultos del pez pajarito *Hyporhamphus regularis ardelio*, presentan un tracto simple, casi libre de pliegues y sin un divertículo gástrico o estómago. Sin embargo, esta especie no puede ser usada como modelo del desarrollo ontogenético temprano del chame, dado que no se reportan publicaciones con un seguimiento histológico del desarrollo del pajarito desde etapas tempranas. Otros estudios de peces agástricos señalan que en el tiburón chino *Myxocyprinus asiaticus* las glándulas digestivas ya están presentes al 6º dpe y la alimentación exógena comienza al 7º dpe, los autores destacan que estos cambios estructurales están motivados por el consumo de rotíferos; lo cual no ha sido posible en el chame dado el tamaño de la abertura de la boca, de 90 µ. Así, las similitudes entre este pez y el chame son mínimas dado que en estos primeros 6 dpe, que coinciden con el periodo de alimentación combinada (endoexotrófica), en el tiburón chino se observan enterocitos, células pancreáticas con gránulos de zimógeno y ductos conectados a las glándulas accesorias del tracto digestivo (Liu *et al*., 2013). Mientras que en el chame, la única coincidencia fue la presencia de células pancreáticas diferenciadas entre 5º y 6º dpe; además de la aparición de dientes mandibulares y papilas gustativas al 5º dpe de forma similar al dentón común; una vez que se registra la apertura de la boca y el ano, se observa un claro desarrollo de las estructuras asociadas al tracto digestivo (Santamaría *et al*., 2004)

En el chame no se distinguieron glándulas gástricas hasta el 6º dpe, aun cuando en otros peces como la dorada *(Sparus aurata)* y la cabrilla arenera *(Paralabrax maculatofasciatus)*, dichas glándulas aparecen hasta el 32º dpe y 15º dpe respectivamente (Sarasquete *et al*., 1997; Peña *et al*., 2003). La ausencia de estas glándulas permite clasificar al chame como un pez agástrico; aunque se observó la proliferación de las células de moco o globet cells, como parte de la mucosa que recubre el esófago, se puede decir que para el chame es

más difícil la digestibilidad de los alimentos y tiene más gasto energético, debido a la ausencia de un estómago funcional y su comportamiento podría ser similar a lo mencionado por Takii *et al.* (1997) para el botete tigre *Takifugu rubipres*, botete *Sphoeroides testudineus* (Targett, 1975) y botete diana *S. annulatus* (García-Gasca *et al*., 2006), ya que estos peces no poseen glándulas gástricas y la mayor parte de la digestión se efectúa en el intestino.

Otras diferencias sustanciales en el desarrollo temprano del chame, es el tiempo en que se consumen las reservas endógenas. En el chame no se observan remanentes del vitelo al 6º dpe; mientras que en larvas del dentón común se observan remanentes del saco vitelino hasta el 6º dpe y de la gota lipídica al día 9º dpe (Santamaría *et al*., 2004). Sin embargo, al igual que en la breca *Pagellus erythrinus*, Micale *et al*. (2006), hasta el 5º dpe, las estructuras como boca y ano abierto con porciones claramente diferenciables tales como bucofaringe, esófago, estómago si va a estar presente y el intestino, incluyendo la presencia de páncreas, hígado y vejiga biliar y glándulas digestivas al 3º dpe, y para 5º dpe el arreglo celular del intestino anterior debe presentar vacuolas como señal de capacidad de transporte, al igual que ductos biliares y pancreáticos, y enrollamiento del intestino. Es importante señalar el hecho que prácticamente la mayoría de dichas estructuras y arreglos celulares estén presentes en el chame entre el 5º-6º dpe, indicaría presuntivamente que en esta etapa, el pez es apto para consumir alimento vivo, aun cuando no estén presentes las reservas endógenas.

Existen muchas otras diferencias evidentes del chame con otras especies, por ejemplo las larvas de la curvina blanca *Atractoscion nobilis* ya presentan un tracto digestivo medianamente diferenciado y evidencia de la presencia de glándulas digestivas funcionales al 3º dpe (Galaviz *et al*., 2011) y en dorada *Sparus aurata*, es clara una etapa lecitoexotrófica o de alimentación combinada (Elbal *et al*., 2004); aun cuando existen coincidencia en arreglos celulares en el intestino y en el mero leopardo *Plectropomus leopardus*, donde al 2º dpe la larva comienza a desarrollar la bucofaringe, esófago, estómago primario y partes del intestino; posteriormente se abre la boca, con un tamaño de 200-250 µ y además presenta una alimentación lecitoexotrofica (Qu *et al*., 2012), mientras que en el chame esta estructura únicamente mide 90 µ en promedio (Rodríguez-Montes de Oca *et al*., 2012). Por lo que además del desarrollo morfológico, una vez que sea posible ubicar presas suficientemente pequeñas para el inicio de la alimentación exógena en el chame, se ve la necesidad de continuar con este estudio enfocado a la actividad digestiva.

Una vez determinado el grado de desarrollo morfológico sería importante describir el patrón de producción y actividad enzimática durante esta primera etapa de transición del tipo de alimentación y el efecto combinado del manejo de las larvas, respecto a variables como temperatura y salinidad, además del tipo de dieta ofrecido (Govoni *et al*., 1986), ya que el tipo de alimento vivo consumido o inerte es de alta relevancia, debido a que una presa o formulación en particular puede contribuir al proceso digestivo de una larva, considerando su posible contribución dada la presencia de enzimas digestivas. Este hecho podría mejorar significativamente la fisiología digestiva del chame, ya que en su conjunto, son parte de muchas características a determinar para establecer la factibilidad del cultivo de esta especie. En consecuencia, el presente trabajo sigue siendo una herramienta útil para lograr el cultivo larvario de un pez, pues indica que tan preparado o no, está un organismo para efectuar su transición a una alimentación exógena (Kolkovski, 2001).

Como segundo componente de este trabajo, se describe el desarrollo del sistema visual de las larvas de *D. latifrons*. Al eclosionar, el sistema visual de la mayoría de las larvas de peces teleósteos es indiferenciado y poco tiempo después se compone del cristalino y retina indiferenciada (Blaxter, 1975; Kawamura *et al*., 1984). Estas características han sido señaladas en larvas del pargo (*Pagrus pagrus*) y pez cardenal (Tovar *et al*., 2009). Esto coincide con lo observado en larvas de *D. latifrons*, ya que al momento de la eclosión no poseen un ojo estructurado; no obstante, se observan algunos elementos dentro de la estructura óptica, pero aún no están completos. Peña & Dumas (2007) comentan que ocurren cambios significativos en el desarrollo del sistema visual durante la etapa en que las larvas poseen el saco vitelino, esto, para asegurar una transición exitosa de la alimentación endógena a la exógena.

La cavidad óptica de *D. latifrons* que se observa el 2º dpe consiste solamente en una estructura precursora del ojo funcional, pero, se observa que la retina se encuentra estratificada. Este nivel de desarrollo coincide con el reportado para algunas especies de agua dulce, como el pez mariposa y pez boga (*Leporinus piau*), así como para las larvas de besugo. En dichas especies, a partir del 1º dpe se observa una estructura ocular semidesarrollada, e incluso pigmentación del ojo proveniente de los bordes de la retina (Borcato *et al*., 2004; Ibrahim *et al*., 2006; Molina, 2011), con la única diferencia que en las larvas del besugo, las células fotorreceptoras estan desarrolladas completamente al 2º dpe (Ibrahim *et al*., 2006). Es importante mencionar que en *D. latifrons*, no obstante que a esta misma edad

el nivel de desarrollo es notable, aún no es posible distinguir una capa específica de los componentes oculares.

Asimismo, durante la etapa de absorción del saco vitelino (0-3 dpe) el ojo se ha diferenciado casi por completo y para el 4º dpe, se observa la córnea, cristalino, iris y retina, así como su epitelio pigmentado, evento considerado como una característica de un sistema visual funcional (Kawamura *et al*., 1984). Los resultados obtenido en el presente estudio, coinciden con lo señalado para larvas de besugo *Pagrus pagrus* pues al día 4º dpe, el patrón de pigmentación del ojo está completo y por lo tanto el sistema visual está completamente desarrollado (Roo *et al*., 1999). Las larvas de *D. latifrons* muestran el epitelio pigmentado a partir del 4º dpe, estado en que está abierto el hocico abierto en la larva; lo que indica que puede iniciar su alimentación exógena y en los días posteriores, no se observaron cambios aparentes en la estructura ocular. Para algunas especies se ha reportado que durante el periodo de nutrición endógena, el ojo no crece en tamaño y que lo observado presenta características similares al desarrollo del epitelio de pigmentación del sistema ocular en larvas de *P. maculatofasciatus* (Peña & Dumas, 2007).

Un aspecto adicional a considerar, es que aun entre organismos de la misma familia, la velocidad con que ocurren los eventos relevantes del desarrollo ontogenético de las larvas de diferentes peces puede variar significativamente, pero hacer una descripción del grado de desarrollo ontogenético, permite establecer las capacidades presentes en términos de digestión en un determinado momento, establecer los requerimientos fisiológicos de una larva, siendo lo anterior la base de la justificación de este trabajo con larvas de chame; destacando que una vez que sea factible continuar con su desarrollo en condiciones de laboratorio, será posible completar una descripción más clara de la funcionalidad y requerimientos alimenticios para lograr el inicio de la alimentación exógena.

CONCLUSIONES

La información generada en este trabajo permite establecer similitudes y diferencias de las larvas de chame *D. latifrons* durante los primeros 6 dpe en comparación con larvas de peces, tanto de ambientes dulceacuícolas como marinos, que se cultivan a diferentes escalas. Aun cuando este organismo es de alta dificultad para desarrollar su cultivo larvario, dado que tanto en Ecuador como en México se ha intentado sin éxito hasta el momento. El grado de diferenciación celular, presencia de estructuras a nivel de tracto digestivo y sistema visual de las larvas de chame son comparables a otros peces, en los que se ha logrado exitósamente la producción de crías, la posibilidad que el componente faltante para efectuar la transición a una alimentación exógena sea uno o varios tipos de presa como alimento vivo aún por identificar (de acuerdo al tamaño de la boca), donde sea factible que el grado de actividad enzimática presente en el momento de iniciar su consumo ya se realice satisfactoriamente la digestión y absorción de sus componentes. Definitivamente, el hecho que gran parte de la información necesaria sobre organogénesis, histomorfología y funcionalidad de las estructuras presentes hasta este punto aún requieran ser establecidas, los resultados presentados dan la pauta para continuar con la búsqueda de las condiciones requeridas para el larvicultivo, en particular a encontrar la presa ideal para la primera alimentación; la siguiente meta es establecer el grado de actividad enzimática durante este periodo de tiempo y poder en el corto plazo, lograr avances significativos encaminados a lograr el cultivo larvario de esta especie de interés para la acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de esta investigación se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número de registro 368450 y de la investigación 09IND03UH- Induced spawning and larval rearing of the “chame” *Dormitator latifrons* in laboratory conditions del proyecto: Human health and aquaculture: health benefits through improving aquaculture sanitation and best management practices. Aquaculture and Fisheries Collaborative Research Support Program (Aquafish CRSP) United States Agency for International Development (USAID). Se agradece la colaboración de la Dra. Maria Celia Portella de la Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Brasil, por su apoyo para el procesamiento histológico de las muestras.

REFERENCIAS

Blaxter, J.H.S. 1975. The eye of larval fish. In: M.A. Ali (ed.). Vision in fishes. New approaches in research. Plenum Press, New York, pp. 427-443.

Bonifáz, N., M. Campos & R. Castelo. 1985. El chame, una nueva fuente de alimentación e ingresos. Fundación Ciencia, Quito, 173 pp.

Borçato, F.L., N. Bazzoli & Y. Sato. 2004. Embryogenesis and larval ontogeny of the “piau-gordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. Rev. Bras. Zool., 21: 117-122.

Castro-Rivera, B., G. Aguilar & G.J.P. Hernández. 2005. Conversión alimenticia de engordas puras y mixtas de

popoyote (*Dormitator latifrons*, Richardson) en estanques de cemento. Rev. Aquat., 23: 45-52.

Cousin, J.C.B., G. Baluet & F. Baudin-Laurencin. 1986. Altérations histologiques observées chez des larves de turbot (*Scophthalmus maximus L.*) en élévage intensif. Aquaculture, 52: 173-189.

Dabrowski, K. 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. Environ. Biol. Fish., 7: 73-76.

Elbal, M.T., M.P. García-Hernández & B. Agulleiro. 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. Aquaculture, 234: 215-238.

Falk-Petersen, I.B. 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. Fish Shellfish Immunol., 19: 397-412.

Flores-Coto, C. & F. Zavala-García. 1982. Descripción de huevos y larvas de *Dormitator maculatus* (Bloch) de la Laguna de Alvarado, Veracrúz. (Pisces: Gobiidae). An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nac. Autón. México, 9: 127-140.

Fuiman, L.E. & A.E. Magurran. 1994. Development of predator defenses in fishes. Rev. Fish Biol. Fish., 4: 145-183.

Galavíz, M.A., A. García-Gasca, M. Drawbridge, A.A. Álvarez-González & M.L. López. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white sea bass, *Atractoscion nobilis*, larvae. Aquaculture, 318: 162-168.

García-Gasca, A., M. Galaviz, J.N. Gutiérrez & A. García-Ortega. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity, and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*). Aquaculture, 256: 366-376.

Gisbert, E., R.H. Piedrahita & D.E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture, 232: 455-470.

Govoni, J.J., G.W Boenhlert & Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. Environ. Biol. Fish., 16: 59-77.

Holt, J.G. 2011. Larval fish nutrition. Wiley-Blackwell, Ukraine, 435 pp.

Ibrahim, F.S., J.R. Krishen, S.G. James & S.A.A. Issa. 2006. Morphological development of post hatch larval goldlined seabream *Rhabdosargus sarba* (Forskal, 1775). Aquacult. Res., 37: 1156-1164.

Kawamura, G., R. Tsuda, H. Kumai & S. Ohashi. 1984. The visual cell morphology of *Pagrus major* and its adaptive changes with shift from pelagic to benthic habitats. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 50: 1975-1980.

Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture, 200: 181-201.

Larumbe, E. 2002. Algunos aspectos biológicos de los popoyotes (*Dormitator latifrons*) en cautiverio. Revista Panorama Acuícola. 25 pp. [http: fis.com/ panoramaacuicola/noticia%203.htm]. Revisado: 2 marzo 2014.

Lauff, M. & R. Hoffer. 1984. Proteolityc enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture, 37: 335-346.

Liu, C.X., Z. Luo, X.Y. Tan & S.Y. Gong. 2013. Ontogenetic development of the digestive system in agastric Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*, larvae. J. World Aquacult. Soc., 44: 350-362.

Medina-Hernández, E.A. 2012. Evaluación de la utilización de alimento vivo o inerte en la supervivencia y crecimiento de larvas del puyeque *Dormitator latifrons*. Tesis de Maestría en Recursos Acuáticos, Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, 44 pp.

Micale, V., M. Garaffo, L. Genovese, M.T. Spedicato & U. Muglia. 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. Aquaculture, 251: 354-365.

Molina, A.A. 2011. Larval development of *Hypsophrys nicaraguensis* (Pisces: Cichlidae) under laboratory conditions. Rev. Biol. Trop., 59: 1679-1684.

Moyano, F.J., M. Díaz, F.J. Alarcón & M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream *(Sparus aurata).* Fish Physiol. Biochem., 15: 121-130.

Navarro-Rodríguez, M.C., V.R. Flores & M.E.R. González. 2004. Distribution and abundance of *Dormitator latifrons* (Richardson) larvae (Pisces: Eleotridae) in the natural protected area "Estero el Salado" in Jalisco, Mexico. Biol. Mar. Oceanogr., 39: 31-36.

O´Connell, P.C. 1981. Development of organ system in the northern anchovy, *Engralius mordax*, and other teleosts. Am. Zool., 21: 429-446.

Peña, R. & S. Dumas. 2007. Desarrollo de la retina en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) bajo condiciones de cultivo. Cienc. Mar., 33: 293-300.

Peña, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte & J. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Aquaculture, 219: 633-644.

Peña, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte & J.L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Aquaculture, 219: 633-644.

Qu, M., S. Ding, X. Xu, M. Shen, Y. You & Y. Su. 2012. Ontogenetic development of the digestive system and growth in coral trout (*Plectropomus leopardus*). Aquaculture, 334: 132-141.

Reséndez, M. 1973. Estudio de los peces de la Laguna de Alvarado, Veracruz, México. An. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., 34: 183-281.

Rivera, M.C. & M. Botero. 2009. Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. Rev. Colomb. Cienc. Pecu., 22: 607-618.

Rodríguez-Montes de Oca, G.A., E.A. Medina-Hernández, J. Velázquez-Sandoval, V.V. López-López, J.C. Román-Reyes, K. Dabrowski & M.C. Haws. 2012. Producción de larvas de Chame (*Dormitator latifrons*, Pisces: Eleotridae) usando GnRHa and LHRHa. Rev. Colomb. Cienc. Pecu., 25: 422-429.

Rodríguez-Montes de Oca, G., E.A. Medina, H.J. Velázquez, S.V. López, L.C. Román-Reyes, K. Dabrowski, E. Gaxiola & M.C. Haws. 2011. Use of gonadotropin releasing hormone analogs on the induced reproduction of chame *Dormitator latifrons*. In: L. Liping & K. Fitzimmons (eds.). Better science, better fish, better life Proceedings of the Ninth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 22-24 Abril, 2011; Beijing, China. Shanghai Ocean University, Shanghai, pp. 187-191.

Roo, F.J., J. Socorro, M.S. Izquierdo, M.J. Caballero, C.M. Hernández-Cruz, A. Fernández & H. Fernandez-Palacios. 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. Aquaculture, 179: 499-512.

Sánchez-Amaya, M.I., J.B. Ortiz-Delgado, Á. García-López, S. Cárdenas & C. Sarasquete. 2007. Larval ontogeny of redbanded seabream (*Pagrus auriga*) Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. Aquaculture, 263: 259-279.

Sandstrom, A. 1999. Visual ecology of fish: a review with special reference to percids. Natl. Bd. Fish. Pub. Fiskeriverket Rapp., 2: 45-80.

Santamaría, C.A., M. Marín de Mateo, R. Traveset, R. Sala, A. Grau, E. Pastor & S. Crespo. 2004. Larval organogenesis in common dentex (*Dentex dentex*) L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. Aquaculture, 237: 207-228.

Received: 1 June 2014; Accepted: 8 January 2015

Sarasquete, C., J. Muñoz-Cueto, J. Arellano, & M. González de Canales. 1997. Histología e histopatología durante el desarrollo larvario de peces de interés en Acuicultura. In: M.L. González de Canales, J.A. Muñoz-Cueto & C. Sarasquete (eds.). Servicios de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz, pp. 11-34.

Takii, K., K. Konishi, M. Ukawa, M. Nakamura & H. Kumai. 1997. Influence of feeding rates on digestion and energy flow in tiger puffer and red sea bream. Fish. Sci., 63: 355-350.

Targett, T. 1975. Food resource partitioning between the puffer fishes *Sphoeroides testudineus* and *S. spengleri* from Biscayne Bay, Florida and other aspects of their biology. M.Sc. Thesis, University of Miami, Miami, 59 pp.

Tovar, M.O., M.J. Obando, E. Gómez, M.L. Caldas & H. Hurtado. 2009. Histología y morfometría del ojo del pez dulceacuícola *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: Characidae). Rev. Biol. Trop., 57: 1107-1118.

Ueberschär, B. 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. Meeresforsch. Rep. Mar. Res., 32: 144-154.

Vázquez, R., S. González, A. Rodríguez & G. Mourente. 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 119: 273-286.

Yang, R., C.X. Xie, Q. Fan, C. Gao & L. Fang. 2010 Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. Aquaculture, 302: 112-123.

Yúfera, M. & M.J. Darías. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture, 268: 53-63.

Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. Part C, Toxicol. Pharmacol., 130: 477-487.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 495-513, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-11

Research Article

Challenges in licensing the industrial double-rig trawl fisheries in Brazil

Paulo Ricardo-Pezzuto[1] & Erica Mastella-Benincà[2]
[1]Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)
Rua Uruguai 458, Centro, CEP 88.302-901, Itajaí, SC, Brazil
[2]Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão, Instituto Federal de Educação
Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC)
Rua Nereu Ramos 3450D, Seminário, CEP 89.813-000, Chapecó, SC, Brazil
Corresponding author: Erica Mastella-Benincà (erica.beninca@ifsc.edu.br)

ABSTRACT. Bottom trawling is important in Brazilian fisheries and is currently highly multi-specific due to the overexploitation of the original targets; unselective fishing method; very large permitted fishing area and the country's high marine biodiversity. Fishing licensing in Brazil was modified in 2012 and is now based in five criteria: target species; "expected by-catch"; "incidental catches"; fishing method and area of operation. Licenses of trawling fleets exhibit, therefore, dozens of species catchable under the first three criteria. In this paper, we analyze industrial double-rig trawling fleets targeting shrimps and demersal fishes, in order to verify in what extent the new system adhere to the current fishing reality, giving new information to improve the current management regime. A total of 4,194 trips from 191 vessels were studied between 2008 and 2010 in southern Brazil. In spite of depending economically on their targets, the fleets are formally authorized to catch a high percentage of species in common (41 to 71%), and the actual landings revealed an even greater overlapping among them (71 to 82%). Vessels licensed to catch demersal fishes obtained nearly 50% of their revenue from items not included in their licenses. It was concluded that the current system encourages excessive effort concentrations over fishing resources, as they can be legally caught by most vessels irrespective of their licenses. It is suggested that licensing should move from a species-based to a spatial-based approach, by defining smaller management areas according to the respective species assemblages. Landing composition would be, therefore, mostly a biological and technological consequence, making management more reasonable and workable under a multi-specific and mega-diverse scenario.

Keywords: management, fishing licensing, demersal fisheries, fishing dynamics, Brazil.

Desafíos en el licenciamiento de la pesca de arrastre industrial tangonera en Brasil

RESUMEN. La pesca de arrastre es importante en las pesquerías brasileñas y actualmente es altamente multi-específica debido a la sobre-explotación de las especies objetivo originales, al método de pesca no selectivo, las grandes áreas de pesca permitidas y a la alta biodiversidad marina del país. En Brasil, la concesión de licencias de pesca fue modificada recientemente. Se definieron licencias bajo cinco criterios: especies objetivo, fauna acompañante esperable, capturas incidentales, método de pesca y área de operación. Según los tres primeros nuevos criterios, las licencias de las flotas arrastreras exhiben decenas de especies capturables. En este trabajo, se analizaron las flotas tangoneras industriales que capturan camarones y peces demersales, en orden a verificar en qué medida el nuevo sistema se adecúa a la realidad pesquera actual y mejora la gestión. Se estudiaron 4.194 viajes realizados por 191 embarcaciones entre 2008 y 2010 en el sur de Brasil. A pesar de depender económicamente de las especies objetivo, las flotas están autorizadas oficialmente a capturar un alto porcentaje de especies coincidentes (41 a 71%), sin embargo los desembarques actuales muestran incluso una superposición mayor (71 a 82%). Las embarcaciones con licencia para peces demersales obtuvieron cerca del 50% de sus ingresos a partir de especies no incluidas en sus licencias. El sistema actual favorece excesivas concentraciones de esfuerzo sobre los recursos pesqueros dado que éstos pueden ser legalmente capturados por la mayoría de las embarcaciones, independientemente de las licencias que poseen. La concesión de licencias debería pasar de un enfoque basado en especies a uno basado en áreas de manejo definidas de acuerdo a los respectivos ensambles de especies. De este modo, la composición de los desembarques sería principalmente una consecuencia biológica y tecnológica, haciendo que la gestión sea más razonable y viable bajo un escenario multi-específico y mega-diverso.

Palabras clave: gestión, licencias de pesca, pesquería demersal, dinámica pesquera, Brasil.

Corresponding editor: Patricio Arana

INTRODUCTION

Licensing of fishing vessels is one of the several tools used by governmental authorities under the fishing regulation process. In some instances, it might represent only a bureaucratic step aiming at registering the units engaged in the fishery for statistical or control purposes (Pope, 2005). On the other hand, it may stand also for a key mechanism to limiting access (or to grant rights), to fishing grounds, and resources (Charles, 2005). If properly enforced, in combination with catch, effort and/or technical measures, (*e.g.*, Doulman, 1987; Harte & Barton, 2007; Havice, 2010), generates government revenues and/or contribute for the biological and socioeconomic sustainability of marine fisheries (Charles, 2005; Pope, 2005; but see Pearse, 1981 for a discussion on the inefficacy of licensing as a tool for controlling fleet capacity, and Fahy (2008) and Shen & Heino (2014), for examples of enforcement limitations).

In Brazil, license requirement for fishing vessels have appeared in federal regulations at least since the Fishing Code of 1938 (Brasil, 1938), substituted in 1967 by the Decree-Law 221/67 (Brasil, 1967) and, more recently, by the Fishing Law of 2009 (Brasil, 2009). All commercial fishing vessels, regardless whether artisanal or industrial, are required to have a license. Licenses are discretionary, precarious, individual, non-transferable and subjected to a quasi-automatic annual renewal if payment of a small tax and complying with some other legal requisites are proven (*e.g.*, regularity with "PREPS", the national vessel monitoring system program, which is obligatory for all industrial vessels and part of the artisanal fleets).

In spite of appearing in the 1950's, the Brazilian industrial fishery developed significantly only from the 1960s on, fueled by intensive governmental financial incentives provided under the Decree-Law of 1967 (Diegues, 1983). The southeastern-south region is a large marine fishing management area (extending from 18º20'S to the Brazilian border with Uruguay), where most of the country's industrial fisheries concentrates. Fleets were originally directed to a few target-species, defined as such by their production (*i.e.*, sardine *Sardinella brasiliensis*, caught by purse seiners), acceptance in the internal market (*i.e.*, scienid fishes, targeted by stern and pair trawlers), or high intrinsic economic value (*i.e.*, shrimps, exploited by side trawlers until 1968-1969, when they were converted to double-rig trawlers) (Valentini & Pezzuto, 2006).

At first, the industrial shrimp fishery operating in the southeastern-south Brazil targeted only the valuable pink-shrimps *Farfantepenaeus paulensis* and *F. brasiliensis*, caught in shelf bottoms between 30 and 80 m depth. The number of vessels in this fleet increased dramatically from nearly 75 units in 1966 to more than 400 in 1972. As a consequence of this huge increment in fishing effort, shrimp yields and fleet size declined rapidly thereafter and the stocks were successively diagnosed as overexploited since 1973 (Valentini *et al.*, 1991, 2012; D'Incao *et al.*, 2002; Ministério do Meio Ambiente, 2004). Simultaneously, an additional industrial fleet aiming at the sea-bob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (hitherto exploited only by artisanal fishers up to 30 m depth) also developed, motivated by the reduction in pink-shrimp yields and increasing in sea-bob shrimp prices in the international market (Valentini & Pezzuto, 2006). After peaking at 15,591 ton in 1981, landings of this species declined to only 5,495 ton in 1999 (D'Incao *et al.*, 2002). Since 2004, the species has been officially recognized as at risk of overexploitation (Ministério do Meio Ambiente, 2004).

The scenario of the pink-shrimp fishery worsened after 1985, when the fleet size increased again to nearly 400 units (D'Incao *et al.*, 2002; Valentini & Pezzuto, 2006). Additionally, in the same year, a third double-rig fleet started to operate in Santa Catarina and Rio Grande do Sul states (Southern Brazil), focusing mostly on the coastal Argentine stiletto shrimp *Artemesia longinaris* (Bate) and Argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate), flatfishes (*Paralichthys patagonicus* Jordan) and angel sharks (*Squatina* spp.) (Haimovici, 1998).

During the 1980's and the following decades, the two first double-rig fleets showed a progressive diversification in their dynamics. Two compensatory strategies were established to overcome the pink and sea-bob shrimp overexploitation: (1) to retain and focus on several other fishes and invertebrates caught as by-catch of traditional resources (Kotas, 1998; Perez & Pezzuto, 1998; Perez *et al.*, 2001, 2007; Tomás & Cordeiro, 2007; Tomás *et al.*, 2007); and (2), by expanding fishing areas to the outer shelf and slope, where new valuable targets and by-catches, started to be exploited (Perez *et al.*, 2001; Perez & Pezzuto, 2006). The two strategies, allied to the poor selectivity of the bottom trawling have made the double-rig fisheries in the region to be largely multi-specific. In fact, the number of commercial categories of fishes and invertebrates landed by the combined double-rig fleets in Santa Catarina state during 2012 surpassed 82 items, several of them comprising more than a single species (*e.g.,* the generic denomination "sharks") (UNIVALI/CTTMar, 2013).

Not only had the fleet dynamics of the double-rig fleets changed with time in the region. Licensing also showed significant modifications, this might be separated in three main phases. The first, encompassed

the beginning of the industrial shrimp fisheries until the early 2000s, when licenses were defined under a monospecific perspective. Vessels were permitted to catch pink and sea-bob shrimps with their respective "incidental catches" (not specifically referred in the respective licenses). However, the importance of the latter increased with time at the same rate that the abundance of the targets declined. Because vessels, authorized to catch shrimps, expanded their operations to new areas and/or resources, and many other trawlers (new or converted from other fisheries) were unsuccessful to get shrimp licenses as their distribution was legally closed. Fishing authorities were pushed politically to accommodate both situations. License characteristics started, then, to become more flexible. At the same time that some licenses remained unchanged, in content, others became progressively more generic and embracing, up to a point where some of them allowed the exploitation, in the whole southeastern-south region, of "fishes, crustaceans and mollusks in general, excluding resources under control" (*i.e.,* excluding species for which new licenses were not available, as the pink-shrimp). Considering the large area of operation permitted, including the traditional sea-bob and pink-shrimp fishing grounds, the poor selectivity of the fishing method and the variety of licenses in force, this system enabled the operation of the double-rig vessels in any area, at any time and on any species (including resources under control, supposedly caught as by-catch). It represents nothing less than a disguise of an open-access regime (Valentini & Pezzuto, 2006).

After severe criticism and aiming at reorganizing the licensing process, in 2011 the Brazilian Ministry of Fisheries and Aquaculture launched a new licensing system (Brasil, 2011), to which all fishing vessels should adhere. Licenses were standardized and formally defined according to five criteria: a) fishing method, b) target species, c) incidental catches of marketable species, d) incidental catches of not marketable species whether due to legal, economic, or other constraints; and e) area of operation permitted. Scientific and vernacular names for the species listed in criteria b), c), and d) above, are formally included in the authorizations.

In this new system, licenses that were previously quite generic turned to be extremely specific and detailed, paradoxically, trying to accommodate the multi-specific feature of the current fisheries through the definition of a long and partially different list of species in each type of authorization. Given the high marine biodiversity of the southeastern-south Brazilian region (see Fig. 9 in Miloslavich *et al.,* 2011) and considering the unselective character of the double-rig bottom trawling fisheries, this change posed new challenges to the management and to the fishing industry as a whole.

Therefore, this paper aims at examining the behavior of the three most important industrial double-rig fleets operating in southeastern-south region of Brazil, as viewed from landings monitored in Santa Catarina harbors between 2008 and 2010. The landings of each fleet was analyzed and confronted with the criteria set out in the new licensing system, in order to verify to what extent this system suit to current fishing reality.

MATERIALS AND METHODS

As information of individual fishing licenses was not made available to the public by the Brazilian government until very recently, the Syndicate of Ship-owners and Fishing Industries of Itajaí and Region (SINDIPI) and Syndicate of Fishing Industry of Florianópolis (SINDIFLORIPA) kindly provided us with copies of licenses of all 234 double-rig vessels of their affiliated members. Nearly all industrial vessels based on Santa Catarina State are associated to one of these syndicates and they represent a significant part of the industrial double-rig fleet operating in southeastern-south region (*i.e.,* 80.7%, 51.3%, and 74.0% of the total number of vessels licensed, respectively, to catch demersal fishes, pink and sea-bob shrimps). Licenses were used to discriminate vessels according to the new licensing system (Table 1), and also to identify and retrieve the corresponding landing information stored in Santa Catarina Industrial Fishing Statistics Program database. This program is conducted by the University of Vale do Itajaí since 2000 and monitors landed catch (composition, weight, and ex-vessel prices), effort, and fishing areas of all industrial fleets which operate in Santa Catarina harbors through logbooks, sales records, and skippers' interviews. Quite frequently, vessels based on other states use local harbors for landing, but their data were not considered in this study, because the respective licenses were not known. From the 234 vessels affiliated to the syndicates, 191 landed in Santa Catarina during the study period.

Vessels authorized to fish pink-shrimp were separated according to the method of catch storage on board (crushed ice or cold chambers-*freezers*), as SINDIPI's technical staff suggested that they could have different operational characteristics (*e.g.*, days at the sea), influencing the respective catch composition. Data on total length and power of the main engine were obtained from licenses and used to provide basic physical characteristics of the fleets.

Table 1. Authorizations, according to the current license system, for industrial double-rig vessels operating in the shelf areas of the southeastern-south (SE-S) region. "Complementary authorization" refers to a temporary license granted to the fleet during the annual pink-shrimp fishery closure (March to May) for operations in areas outside the main target distribution.

Authorization	Target species	Expected by-catch	Area of operation
Pink-shrimp	Pink-shrimp, Argentine red shrimp and Argentine stiletto shrimp	Argentine conger, Argentine croaker, Argentine goatfish, Argentine hake, Atlantic bigeye, blue runner, Brazilian codling, Brazilian flathead, comb grouper, common octopus, crab, dogfish, flatfish, grey triggerfish, Jamaica weakfish, king weakfish, lane snappers, largehead hairtail, monkfish, namorado sandperch, pink cusk-eel, rays, red grouper, red porgy, rough scad, sea trout, slipper lobster, snappers, snowy grouper, southern searobin, squid, striped weakfish, tile fish, Uruguayan lobster, whitemouth croaker	Territorial sea SE-S; and EEZ SE-S (complementary authorization: outside the pink-shrimp area - above 100 m)
Sea-bob shrimp	Sea-bob shrimp, Argentine red shrimp and Argentine stiletto shrimp	Argentine croaker, Argentine goatfish, banded croaker, bluewing searobin, Brazilian codling, crabs, dogfish, flatfish, grey triggerfish, Jamaica weakfish, king weakfish, monkfish, rays, sea trout, southern kingcroaker, southern white shrimp, squid, striped weakfish, whitemouth croaker	Territorial sea SE-S; and EEZ SE-S
Demersal fish	Whitemouth croaker, Argentine croaker, sea trout and king weakfish, flatfish, Brazilian codling, bluewing searobin	Argentine conger, Argentine goatfish, Atlantic bigeye, banded croaker, blue runner, Brazilian flathead, comb grouper, croakers, drums, Jamaica weakfish, lane snappers, largehead hairtail, monkfish, namorado sandperch, pink cusk-eel, rays, red grouper, red porgy, slipper lobster, snappers, snowy grouper, southern kingcroaker, squid, striped weakfish, tile fish, Uruguayan lobster	Territorial sea SE-S and EEZ SE-S (depths less than 250 m)

Spatial distribution of the total fishing effort was also analyzed for each fleet. Firstly, fishing areas visited in each trip, as informed by the skippers during interviews or pointed out in the respective log books were ascribed to a 30'x30' grid. More than a single quadrant could be assigned, as more than frequently a same trip covered several quadrants (*i.e.*, fishing grounds extended for very large areas along the shelf). The total number of trips recorded by quadrant during the whole study period was then calculated and mapped for each fleet.

Two main analyses were conducted from landing data: a) catch was examined in terms of weight and revenue per biological species/commercial categories and b) catch was broken down into the categories "target-species" and "expected by-catch", as defined in the respective licenses (Table 1). Landed items not listed in the authorizations were classified as "others". Correspondence between vernacular and scientific names of all species mentioned in this paper can be found in Table 2.

The proportion by weight and by revenue, measured in Brazilian currency, (Reais R$, conversion rate of US$1.00 = R$1.70 in December 1st, 2010) that each item accounted for, in relation to the total landings of each fleet, was calculated per year, and for the whole study period, to investigate their role in the maintenance of the respective fishing fleets.

To enable proper comparison of revenues, along the three studied years, monthly mean prices (US$/kg) of each species were corrected for inflation to the reference date of December 2010. The Producer Price Index (PPI) (Índice de Preços ao Produtor Amplo-Fundação Getúlio Vargas, 2012), which records the monthly variation of prices of agricultural and industrial goods at the producer level, *i.e.* before final marketing, was used. Mean ex-vessel price (Price - US$/kg) of the species/commercial category *i* in the month/year *j* was, standardized as follows:

$$Corrected\ price_{ij} = Price_{ij} \times \left(\frac{PPI_{December2010}}{PPI_j} \right)$$

RESULTS

Fleet characteristics

A total of 2,617 trips and 46,711 ton were monitored in the study period. From the 191 vessels analyzed, 68

Table 2. Vernacular and scientific names of the species landed and/or listed in the licenses of the industrial double-rig fleets of Santa Catarina State, southern Brazil.

Vernacular name	Scientific name	Family
Angel sharks	*Squatina* spp.	Squatinidae
Argentine conger	*Conger orbignianus*, *Myrophis punctatus*, *Raneya brasiliensis*	Congridae Ophichthidae Ophidiidae
Argentine croaker	*Umbrina canosai*	Sciaenidae
Argentine goatfish	*Mullus argentinae*	Mullidae
Argentine hake	*Merluccius hubbsi*	Phycidae
Argentine red shrimp	*Pleoticus muelleri*	Penaeidae
Argentine stiletto shrimp	*Artemesia longinaris*	Penaeidae
Atlantic bigeye	*Priacanthus arenatus*	Priacantidae
Banded croaker	*Paralonchurus brasiliensis*	Sciaenidae
Blue runner	*Caranx crysos*	Carangidae
Bluewing searobin	*Prionotus punctatus*	Triglidae
Brazilian codling	*Urophycis brasiliensis*	Phycidae
Brazilian flathead	*Percophis brasiliensis*	Percophidae
Codling	*Urophycis mystacea*	Phycidae
Comb grouper	*Mycteroperca bonaci*, *M. microlepis*, *M. acutirostris*	Serranidae
Common octopus	*Octopus vulgaris*	Octopodidae
Crab	*Callinectes sapidus*, *C. bocourti*, *C. danae*, *C. ornatus*	Portunidae
Croakers	*Stellifer brasiliensis*; *S. rastrifer*; *S. naso*	Sciaenidae
Dogfishs	*Prionace glauca*, *Carcharhinus falciformis*, *Isurus oxyrinchus,* *Squalus acanthias*, *S. cubensis*, *S. blainville*, *Mustelus fasciatus*	Carcharhinidae Lamnidae Squalidae Triakidae
Drums	*Cynoscion acoupa*, *C. leiarchus*, *C. guatucupa*, *Larimus breviceps*, *Pogonias cromis*	Sciaenidae
Flatfish	*Paralichthys brasiliensis*, *P. patagonicus*	Paralichthydae
Grey triggerfish	*Balistes capriscus*	Balistidae
Jamaica weakfish	*Cynoscion jamaicensis*	Sciaenidae
King weakfish	*Macrodon ancylodon*	Sciaenidae
Largehead hairtail	*Trichiurus lepturus*	Trichiuridae
Monkfish	*Lophius gastrophysus*	Lophiidae
Namorado sandperch	*Pseudopercis numida*	Mugiloididae
Pink cusk-eel	*Genypterus brasiliensis*	Ophidiidae
Pink-shrimp	*Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis*	Penaeidae
Rays	*Atlantoraja cyclophora*, *A.castelnaui; Rioraja agassizii*, *Breviraja spinosa*, *Rajella purpuriventralis*	Rajidae
Red grouper	*Epinephelus morio*	Serranidae
Red porgy	*Pagrus pagrus*	Sparidae
Rough scad	*Trachurus lathami*	Carangidae
Sand flounder	*Paralichthys isósceles*, *P. triocellatus*	Paralichthydae
Sea trout	*Cynoscion* spp.	Sciaenidae
Sea-bob shrimp	*Xiphopenaeus kroyeri*	Penaeidae
Skate raja	*Atlantoraja platana*, *Sympterygia bonapartii*, *S. acuta*	Rajidae
Slipper lobster	*Scyllarides deceptor*, *S. brasiliensis*, *S. delfosi*	Scyllaridae
Snappers	*Lutjanus cyanopterus*, *L. jocu*, *L. synagris*, *Ocyurus chrysurus*, *Rhomboplites aurorubens*	Lutjanidae
Snowy grouper	*Epinephelus niveatus*, *E. morio*	Serranidae
Southern kingcroaker	*Menticirrhus* spp.	Sciaenidae
Southern white shrimp	*Litopenaeus schimitti*	Penaeidae
Spiny dogfish	*Squalus* spp.	Squalidae
Squid	*Loligo plei*, *L. sanpaulensis*	Loliginida
Striped soldier shrimp	*Plesionika edwardsii*	Pandalidae
Striped weakfish	*Cynoscion striatus*	Sciaenidae
Tile fish	*Lopholatilus villarii*	Branchiostegidae
Uruguayan lobster	*Metanephrops rubellus*	Nephropidae
Whitemouth croaker	*Micropogonias furnieri*	Sciaenidae

were licensed for pink-shrimp. They used crushed ice as catch conservation method (hereafter referred to as pink-shrimp icing vessels). Sea-bob shrimp and demersal fish fleets totalized 47 and 44 units, respectively. Only 32 pink-shrimp vessels were equipped with cold chambers (pink-shrimp freezers; Table 3). The demersal fish fleet showed mean yields/trip much higher than those exhibited by the other vessels and accounted for 54.5% of the total landings. Excepting for the number of trips which reduced from 2008 to 2010 in all fleets, the other variables did not show important changes in the period (Table 3).

As revealed by Kruskal-Wallis tests, the fleets differed both in their median lengths (H = 114.7; N = 192; $P < 0.0001$) and engine power (H = 101.9; N = 190; $P < 0.0001$). A post-hoc test showed that vessels targeting sea-bob shrimp were the smallest (median total length = 14.8 m) as compared to the other fleets ($P < 0.0001$). Pink shrimp freezers and vessels targeting demersal fishes on the other hand did not show differences among them ($P = 0.96$) but were bigger than the other vessels ($P < 0.01$). The same results were found when contrasting median engine power among the fleets. In this case, differences among pink shrimp freezers + demersal fish vessels and the other fleets were even more significant ($P < 0.001$) (Table 4).

As previously suspected, the use of crushed ice instead of cold chambers limits the permanence of the vessels at the sea. On average, fishing trips of pink-shrimp icing vessels lasted only 18.5 days, contrasting with the 34.5 days spent by the pink-shrimp freezer fleet (Table 5). Haul duration and number of hauls per day differed also between the two pink-shrimp fleets, freezers conducting less and longer hauls per day. Sea-bob shrimp vessels showed the lowest autonomy among the four fleets spending, on average, 17 days at sea. Their hauls were also the shortest (mean = 4.0 h), resulting in a higher number of tows per day (Table 5).

Spatial distribution of fishing effort

Freezers operate from north of Vitoria to the border with Uruguay, mostly in fishing grounds shallower than 100 m. However, areas between 100 and 200 m deep or even down to the slope were also exploited, mainly between Santos e Itajaí harbors. The area between Itajaí and Paranaguá concentrated the highest number of trips per quadrant (Fig. 1a). Effort of the pink-shrimp icing fleet was much more spread, occupying all the continental shelf and upper slope from Rio de Janeiro to the border with Uruguay. Trips concentrated in two main areas: towards the north of Itajaí, between 50 and 100-200 m isobaths, and towards the south of the same harbor, in shallower waters (Fig. 1b). The sea-bob shrimp fleet showed also a continuous occupation of the continental shelf, though rarely exceeding 100 m deep. In fact, most of the trips concentrated in very coastal areas below 50 or even 25 m deep, especially between Cananéia and Santos harbors. This fleet rarely, if ever, operated on slope grounds (Fig. 1c). Spreading its fishing effort essentially throughout the same areas where pink-shrimp icing vessels operate, demersal fish fleet exploited two main fishing grounds: the first, situated along the outer shelf and slope between Santos and Laguna and the second, on the inner shelf from Laguna towards the southern end of the study area (Fig. 1d).

Catch composition per species or category

From the main resources landed by the double-rig fleets in Santa Catarina, the pink-shrimp stands out as the most valuable, with mean prices per kilogram exceeding twice the southern white shrimp, which ranked second on the price scale (Table 6). Complement the "top ten" items in terms of intrinsic value other three shrimps: the Uruguayan lobster, squid and flatfish, all species exploited on the continental shelf, and the monkfish and codling caught on the slope (Table 6). Although price fluctuations had been noticed throughout the study period, no definite pattern was observed. Whereas the price of pink and Argentine stiletto shrimps decreased from 2008 to 2010, other species showed continuous appreciation in the same period (*e.g.,* Uruguayan lobster) or were valued differently in each year (Table 6).

Examining the catch composition per fleet revealed some distinct patterns among them. The pink-shrimp freezers landed 56 species/categories, but only ten accounted for over 81% of the total weight and 96% of revenue (Table 7). The fleet showed to be essentially shellfish-oriented as four shrimp species, the squid and the Uruguayan lobster comprised six out of the ten main items landed in terms of value, with the pink-shrimp demonstrating, by far, the largest importance. Mixture (a multi-species assortment of items of low individual value) amounted 19% of the total weight, a value very close to the pink-shrimp contribution (22%). Landings totalized 2,154 ton and more than US$10 million in the study period.

Pink-shrimp icing vessels showed a more diversified pattern, as 68 species/categories were landed and 13 of them were necessary to generate, respectively, 82 and 90% of the landed weight and revenue monitored in the period (Table 8). While revenues from the pink-shrimp summed 77% in freezer vessels, its importance decreased to 35% in the icing fleet (corresponding to only 4% of the landed weight), with other shrimps increasing their participation in the

Table 3. Temporal variation in number of vessels, number of trips, total landed catch (ton), and mean catch rate (ton/trip) of the industrial double-rig fleets of Santa Catarina State, Southern Brazil, as recorded by the Santa Catarina Industrial Fishing Statistics Program. Pink-shrimp vessels were separated according to the catch storage method.

Fleet	Period															
	2008				2009				2010				Total			
	Vessels	Trips	Landings (ton)	ton/trip	Vessels	Trips	Landings (ton)	ton/trip	Vessels	Trips	Landings (ton)	ton/trip	Vessels	Trips	Landings (ton)	ton/trip
Pink-shrimp (total)	85	444	5,040.4	11.4	89	417	5,011.5	12.0	81	355	3,631.6	10.2	100	1,216	13,683.5	11.3
Pink-shrimp freezer	27	107	883.3	8.3	25	85	740.8	8.7	23	63	529.7	8.4	32	255	2,153.8	8.4
Pink-shrimp icing	58	337	4,157.2	12.3	64	332	4,270.7	12.9	58	292	3,101.9	10.6	68	961	11,529.8	12.0
Sea-bob shrimp	39	232	3,003.4	12.9	43	176	2,126.1	12.1	43	214	2,419.5	11.3	47	622	7,549.0	12.1
Demersal fishes	39	287	9,063.9	31.6	37	242	7,835.3	32.4	37	250	8,579.4	34.3	44	779	25,478.7	32.7
Total	163	963	17,107.8	17.8	169	835	14,973.0	17.9	161	819	14,631	17.9	191	2,617	46,711.3	17.8

Table 4. Total length (m) and main engine power (HP) of the industrial double-rig fleets of Santa Catarina State, southern Brazil. Values are medians (minimum-maximum). Pink-shrimp vessels were separated according to the catch storage method.

Fleet	Total length (m)	Main engine power (HP)
Pink-shrimp freezer	21.9 (17.9 - 22.5)	325 (170 - 425)
Pink-shrimp icing	18.4 (13.2 - 24.2)	227.5 (110 - 425)
Sea-bob shrimp	14.6 (10.5 - 18.3)	130 (90 - 325)
Demersal fishes	22.1 (17.6 - 24.8)	325 (175 - 425)

fleet economy. The Argentine stiletto shrimp and mixture were the most abundant items in the landings. Fleet's revenues and landed weight exceeded US$22 million and 11,500 ton in the study period, respectively.

Among 50 species/categories recorded, only seven of them provided 95% of the landings and revenues for the sea-bob shrimp fleet (Table 9). In spite of being traditionally the fleet's main target, landed weight and revenue obtained from the sea-bob shrimp figured below the Argentine stiletto shrimp, whose landings accounted for 50% of the total. Conversely, given its lower individual price as compared to the sea-bob shrimp (Table 6), the contribution of the Argentine stiletto shrimp in the total revenue was only marginally superior. The Argentine red shrimp, which is caught in association with the latter species in coastal fishing grounds southwards from the main sea-bob shrimp area of distribution, showed also significant importance, accounting for 11% of the volume and 20% of the revenue in the period. These two southern shrimps, therefore, revealed to play a key role in the current dynamics of the sea-bob shrimp fleet, whose total landings in the period attained 7,549 ton and US$12.1 million (Table 9).

As expected, fishes were the main items caught by the demersal fishes fleet, with nine species plus the "not discriminated" category accounting for over 77% of the weight and 81% of the revenue (Table 10). Among the 68 species/categories landed, codling, flatfish, Argentine hake, and bluewing searobin were dominant in both criteria. In spite of contributing with only 7% of the landed weight, flatfishes corresponded to 18% of the total fleet's revenues (US$29.6 million), given its high individual value (US$3.09 kg^{-1}) as compared to the other three species (*e.g.*, codling - US$1.26 kg^{-1}) (Tables 6-10).

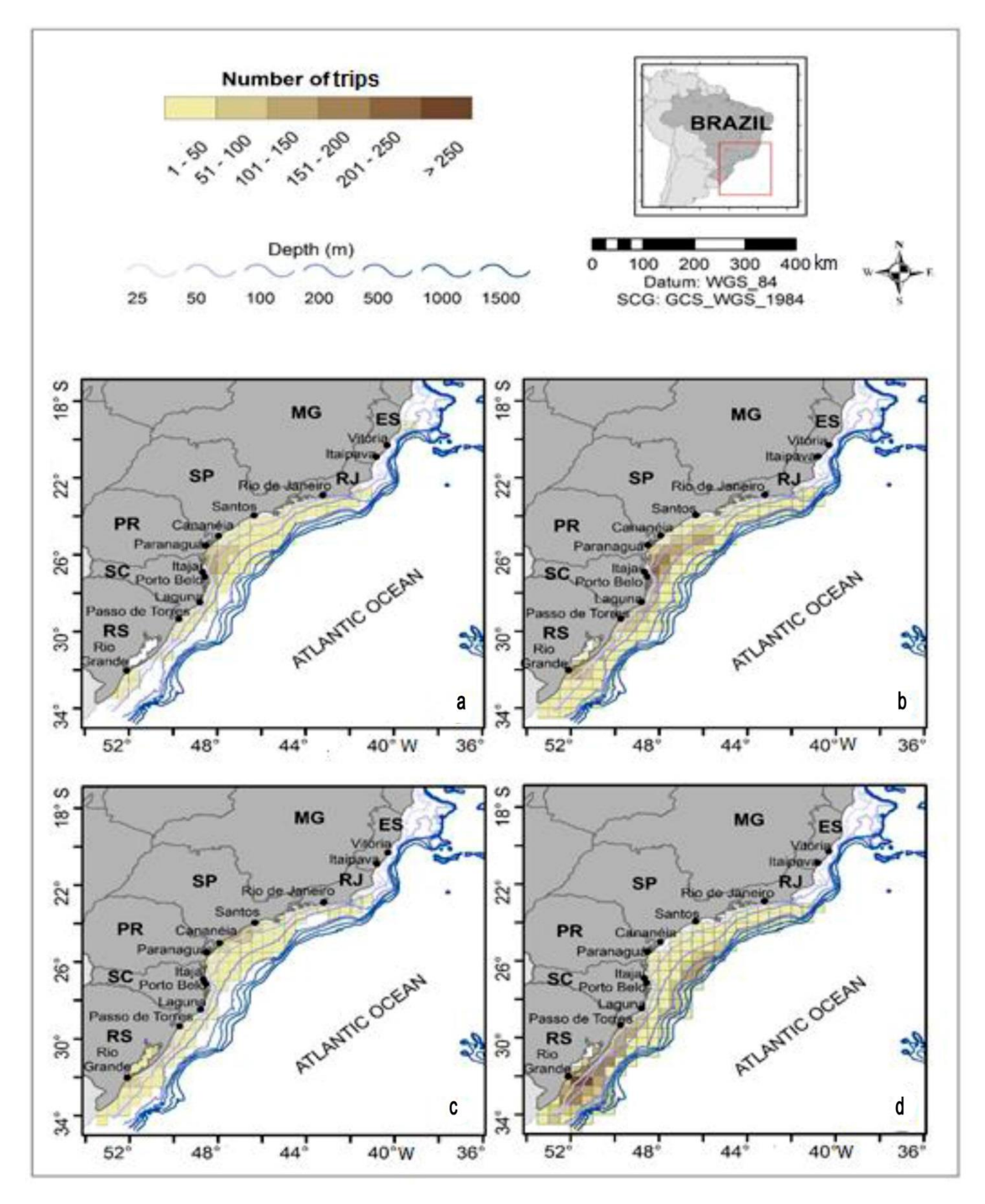


Figure 1. Spatial distribution of fishing effort (number of trips) of the four industrial double-rig fleets of Santa Catarina State, southern Brazil, monitored between 2008 and 2010 and licensed for: a: pink-shrimp, equipped with cold chambers (freezer), b: pink-shrimp using crushed ice, c: sea-bob shrimp and d: demersal fishes. Main fishing harbors are indicated. ES, MG, RJ, SP, PR, SC and RS refer, respectively, to the Brazilian states of Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul.

Table 5. Operational characteristics the industrial double-rig fleets of Santa Catarina State, southern Brazil. Values are medians (minimum-maximum), except for number of trips. Pink-shrimp vessels were separated according to the catch storage method.

Fleet	Number of trips	Days at sea	Days at fishing	Hauls/Day	Haul duration (h)
Pink-shrimp freezer	216	34.5 (3-60)	26 (3-50)	4 (2-7)	5.5 (1.8-8)
Pink-shrimp icing	875	18.5 (6-36)	15 (3-33)	5 (2-8)	4.5 (2-7)
Sea-bob shrimp	464	17 (7-30)	14 (3-27)	5 (3-10)	4.0 (2-6)
Demersal fishes	714	24 (6-30)	18 (3-30)	4 (2-6)	4.7 (2.5-6.5)

Table 6. Mean ex-vessel prices of the main fishery resources exploited by the industrial double-rig fleets of Santa Catarina State, southern Brazil. All prices are in Brazilian currency (US$/kg) and were standardized to the reference date of December 2010. SD: standard deviation, Not discriminated: items whose composition was unknown, Mixture: a specific item of the landings composed by low-valued species landed and sold on an aggregated basis.

Species or commercial categories	Year						Mean
	2008		2009		2010		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Pink-shrimp	19.71	0.79	15.44	2.25	14.98	0.85	16.71
Southern white shrimp	7.70	1.41	9.26	0.49	-		8.48
Uruguayan lobster	4.50	1.30	6.71	1.76	8.52	0.00	6.58
Argentine red shrimp	3.17	0.38	3.08	0.66	3.46	0.14	3.24
Flatfishh	3.18	0.58	3.26	0.62	2.84	0.25	3.09
Striped soldier shrimp	2.84	0.17	2.59	0.35	-		2.72
Squid	0.99	0.62	2.21	1.28	2.82	0.21	2.01
Sea-bob shrimp	1.90	0.09	1.60	0.33	1.99	0.15	1.83
Monkfish	1.34	0.15	1.47	0.19	1.55	0.34	1.45
Not discriminated	1.39	0.06	1.29	0.06	1.27	0.04	1.32
Codling	1.19	0.06	1.33	0.16	-		1.26
Argentine stiletto shrimp	1.39	0.28	1.37	0.36	0.94	0.09	1.23
Brazilian codling	1.00	0.17	1.09	0.09	0.86	0.09	0.98
Sand flounder	0.88	0.10	1.10	0.14	0.72	0.05	0.90
Bluewing searobin	0.82	0.04	0.81	0.12	0.82	0.08	0.82
Argentine hake	0.78	0.13	0.84	0.08	0.79	0.15	0.80
Striped weakfish	0.78	0.12	0.81	0.07	0.73	0.15	0.78
Dogfishs	0.54	0.00	1.00	0.00	-		0.77
Skate raja	0.74	0.03	0.74	0.09	0.75	0.12	0.74
Grey triggerfish	0.74	0.13	0.69	0.08	0.71	0.05	0.72
Mixture	0.40	0.02	0.45	0.06	0.46	0.08	0.44

Catch composition according to the license system

In the pink-shrimp freezer fleet, nearly 80% of revenues were obtained from the target-species (as defined in the respective licenses), in spite of their very small participation in terms of volume (Fig. 2). This difference is explained by the predominance of the valuable pink-shrimp in the landings, mostly when compared to the two other possible targets (*i.e.,* Argentine red and stiletto shrimps), whose amount and individual prices were significantly lower (Tables 6, 7). In terms of weight, the most important category was the "expected by-catch" which attained, in 2010, nearly 50% of the total landings. Species not listed in the licenses had also a significant participation in terms of weight, in spite of representing less than 5% of the revenues (Fig. 2).

Targets were also the main items for the economic sustainability of the pink-shrimp icing fleet, even considering that their importance in the total revenue declined to *ca.* 60%. Considering the whole study period,

Table 7. Weight (ton) and revenue (US$) of the main items landed between 2008 and 2010 in Santa Catarina State by the local industrial fleet licensed to catch pink-shrimps. Only vessels that use cold chambers (freezers) to conserve the catch aboard were considered. Prices were standardized to the reference date of December 2010. Mixture: a specific item of the landings composed by low-valued species landed and sold on an aggregated basis.

Species or commercial categories	Year						Total			
	2008		2009		2010					
	ton	US$	ton	US$	ton	US$	ton	%	US$	%
Pink-shrimp	174	3,432,559	192	2,898,560	100	1,530,971	465	22	7,862,089	77
Squid	43	44,641	44	154,116	124	365,105	211	10	563,862	6
Uruguayan lobster	25	135,619	19	145,334	14	121,700	58	3	402,654	4
Codling	69	84,101	52	75,767	37	44,718	157	7	204,587	2
Mixture	135	54,502	179	83,211	94	47,972	407	19	185,685	2
Brazilian codling	75	82,840	41	42,739	26	22,709	142	7	148,288	1
Striped soldier shrimp	33	90,368	9	25,237	6	15,168	48	2	130,773	1
Bluewing searobin	43	35,592	73	60,148	16	12,927	132	6	108,667	1
Argentine stiletto shrimp	71	82,562	-	-	26	22,165	97	4	104,726	1
Argentine red shrimp	28	84,074	0	824	3	8,640	31	1	93,539	1
Total	883	4,327,060	741	3,617,671	530	2,280,568	2,154	81	10,225,299	96

Table 8. Weight (ton) and revenue (US$) of the main items landed between 2008 and 2010 in Santa Catarina state by the local industrial fleet licensed to catch pink-shrimps. Only vessels that use crushed ice to conserve the catch aboard were considered. Prices were standardized to the reference date of December 2010. Mixture: a specific item of the landings composed by low-valued species landed and sold on an aggregated basis.

Species or commercial categories	Year						Total			
	2008		2009		2010					
	ton	US$	ton	US$	ton	US$	ton	%	US$	%
Pink-shrimp	130	2,559,972	229	3,311,348	125	1,907,278	484	4	7,778,598	35
Argentine stiletto shrimp	1,252	1,520,070	1,138	1,328,928	888	836,791	3,278	28	3,685,789	16
Argentine red shrimp	483	1,527,166	297	764,166	48	166,03	828	7	2,457,362	11
Flatfish	159	508,721	167	546,255	81	229,234	407	4	1,284,210	6
Uruguayan lobster	35	180,962	55	341,837	37	312,784	127	1	835,583	4
Codling	194	229,662	195	256,392	189	221,095	578	5	707,149	3
Bluewing searobin	367	302,219	296	238,004	125	95,335	788	7	635,559	3
Striped soldier shrimp	53	147,063	29	74,082	156	380,081	238	2	601,226	3
Mixture	309	124,691	576	258,555	427	204,342	1,312	11	587,588	3
Squid	27	18,589	14	46,478	136	385,116	177	2	450,183	2
Brazilian codling	191	195,203	202	219,699	73	62,751	466	4	477,653	2
Sand flounder	134	123,296	123	129,265	81	58,737	339	3	311,298	1
Skate raja	151	111,288	172	118,104	87	61,56	410	4	290,952	1
Total	4,157	8,326,331	4,271	8,382,214	3,102	5,684,868	11,530	82	22,393,414	90

targets and expected by-catch species had similar contribution in terms of weight, although different patterns had been observed from year to year. Nearly 20% of the landings corresponded to items not included in the licenses, but, as observed in the pink-shrimp freezer fleet, their input to the total revenue was small (Fig. 3).

Sea-bob shrimp fleet revealed totally reliant from the three shrimp listed as targets, as they represented nearly 90% of the respective landings and revenues. The remaining 10% were equally divided between the other two categories (Fig. 4). On the other hand, demersal fish vessels were sustained mostly by species not listed in their respective licenses as nearly 50% of the landings and revenue originate from their catches (Fig. 5). Targets contribution in weight and revenue varied between *ca.* 20 and 30% and between 30 and 40%, respectively, depending on the year. Compara-

Table 9. Weight (ton) and revenue (US$) of the main items landed between 2008 and 2010 in Santa Catarina State by the local industrial fleet licensed to catch sea-bob shrimp. Prices were standardized to the reference date of December 2010. Mixture: a specific item of the landings composed by low-valued species landed and sold on an aggregated basis.

Species or commercial categories	Year						Total			
	2008		2009		2010					
	ton	US$	ton	US$	ton	US$	ton	%	US$	%
Argentine stiletto shrimp	1,702	2,132,188	999	1,158,630	1,040	976,405	3,741	50	4,267,223	35
Sea-bob shrimp	501	964,036	596	868,721	1,124	2,240,375	2,221	29	4,073,132	34
Argentine red shrimp	525	1,643,487	229	634,611	60	206,578	814	11	2,484,676	20
Southern white shrimp	10	82,005	19	165,895	15	113,630	44	1	361,530	3
Mixture	80	45,318	113	191,369	66	50,962	259	3	287,649	1
Flatfish	11	31,102	6	51,164	8	30,448	24	0	112,714	1
Pink-shrimp	2	30,339	13	20,110	3	23,170	19	0	73,619	2
Total	3,003	5,131,339	2,126	3,233,821	2,419	3,817,836	7,549	94	12,182,997	96

Table 10. Weight (ton) and revenue (US$) of the main items landed between 2008 and 2010 in Santa Catarina State by the local industrial fleet licensed to catch demersal fishes. Prices were standardized to the reference date of December 2010. Not discriminated: items whose composition were unknown.

Species or commercial categories	Year						Total			
	2008		2009		2010					
	ton	US$	ton	US$	ton	US$	ton	%	US$	%
Codling	2,182	2,612,909	2,388	3,157,721	2,194	2,508,868	6,764	27	8,279,498	28
Flatfish	659	2,155,298	553	1,904,528	493	1,391,747	1,704	7	5,451,573	18
Argentine hake	894	716,485	1,210	1,053,460	961	753,176	3,065	12	2,523,120	8
Bluewing searobin	1,214	1,010,630	542	422,346	773	609,799	2,529	10	2,042,775	7
Monkfish	242	327,107	322	473,905	557	882,953	1,121	4	1,683,966	6
Brazilian codling	574	590,406	240	258,841	299	259,252	1,113	4	1,108,499	4
Not discriminated	386	612,561	131	203,615	122	161,347	638	3	977,523	3
Skate raja	378	308,059	327	231,558	358	255,777	1,064	4	795,394	3
Striped weakfish	296	213,553	216	174,155	277	204,784	790	3	592,492	2
Grey triggerfish	225	170,063	264	168,853	322	230,278	811	3	569,195	2
Total	9,064	10,723,166	7,835	9,981,431	8,579	8,959,541	25,479	77	29,664,139	81

tively, species listed as expected by-catch always a played smaller role for this fleet (Fig. 5).

Although differing as to the dependence on the categories "targets", "expected by-catch", and "others", the four fleets presented a high percentage of coincidental species. Comparing the species listed in the three types of licenses, the percentage of coincidental items varied from a minimum of 31.8% between sea-bob shrimp and demersal fish fleets to a maximum of 71.1% between the latter and the pink-shrimp fleets (Table 11). When considering the landings actually performed between 2008 and 2010, the overlapping in catch composition increased significantly, reaching 82.4% between demersal fishes and pink-shrimp icers fleet (Table 11).

DISCUSSION

In force since 2011, the new Brazilian fishing licensing scheme has produced some beneficial outcomes, standardizing licenses, characteristics, and increasing the control and transparency in the system as a whole. However, the present results reveal that, at least concerning the bottom industrial double-rig fisheries, this system has not reverted neither the excessive effort and overlapping among fleets, nor the quite generalist access rights conferred by the preceding collection of non-standardized licenses which, among other negative consequences, posed the sustainability of the exploited demersal stocks on a high level of risk.

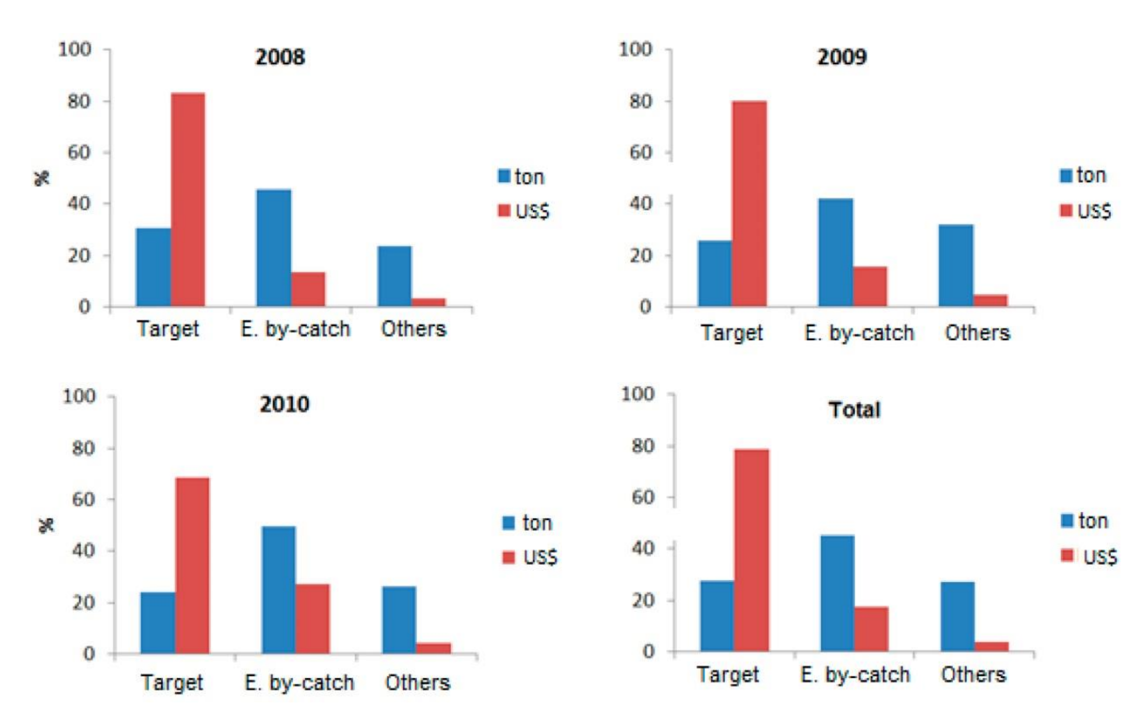


Figure 2. Contribution in weight (ton) and revenue (US$) of target and expected by-catch species as defined in the industrial double-rig pink-shrimp licenses, according to landings monitored in Santa Catarina State, between 2008 and 2010. "Other" refers to species not listed in the licenses. Only vessels using cold chambers (freezers) to conserve the catch aboard were considered.

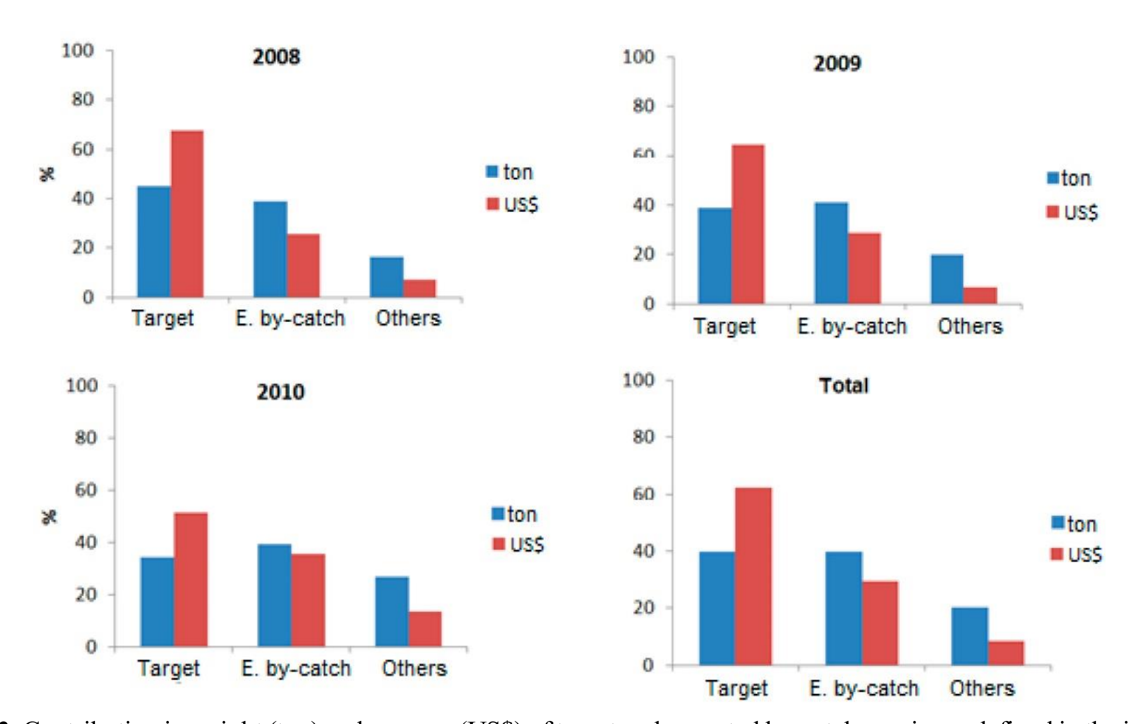


Figure 3. Contribution in weight (ton) and revenue (US$) of target and expected by-catch species as defined in the industrial double-rig pink-shrimp licenses, according to landings monitored in Santa Catarina State, between 2008 and 2010. "Other" refers to species not listed in the licenses. Only vessels using crushed ice to conserve the catch aboard were considered.

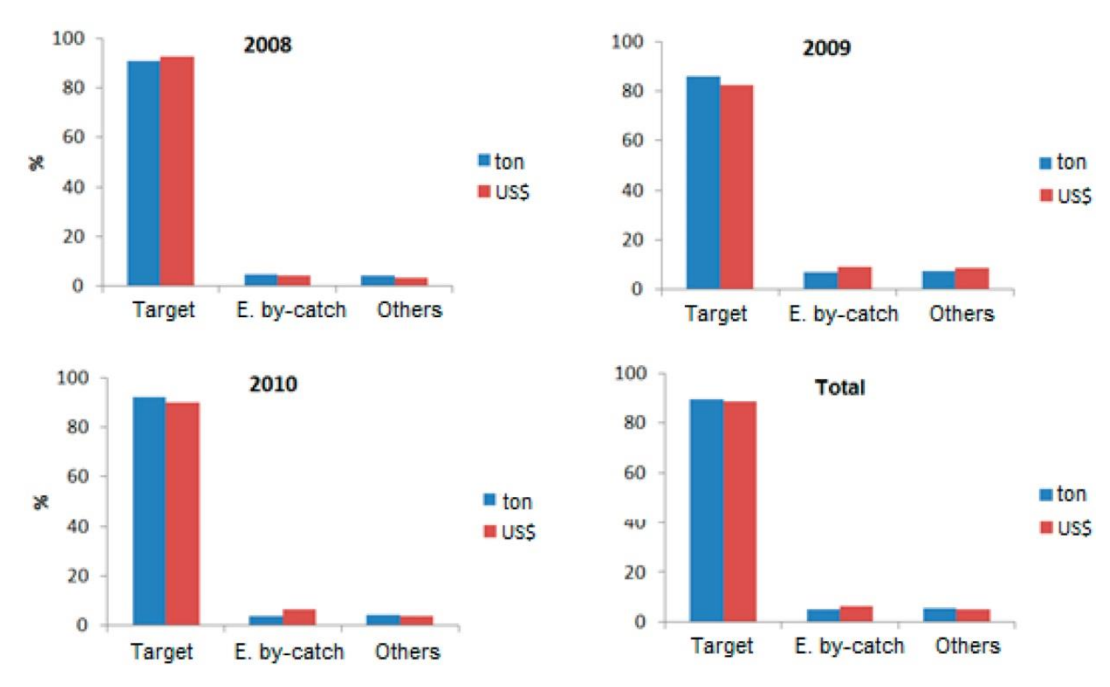


Figure 4. Contribution in weight (ton) and revenue (US$) of target and expected by-catch species as defined in the industrial double-rig sea-bob shrimp licenses, according to landings monitored in Santa Catarina State, between 2008 and 2010. "Other" refers to species not listed in the licenses.

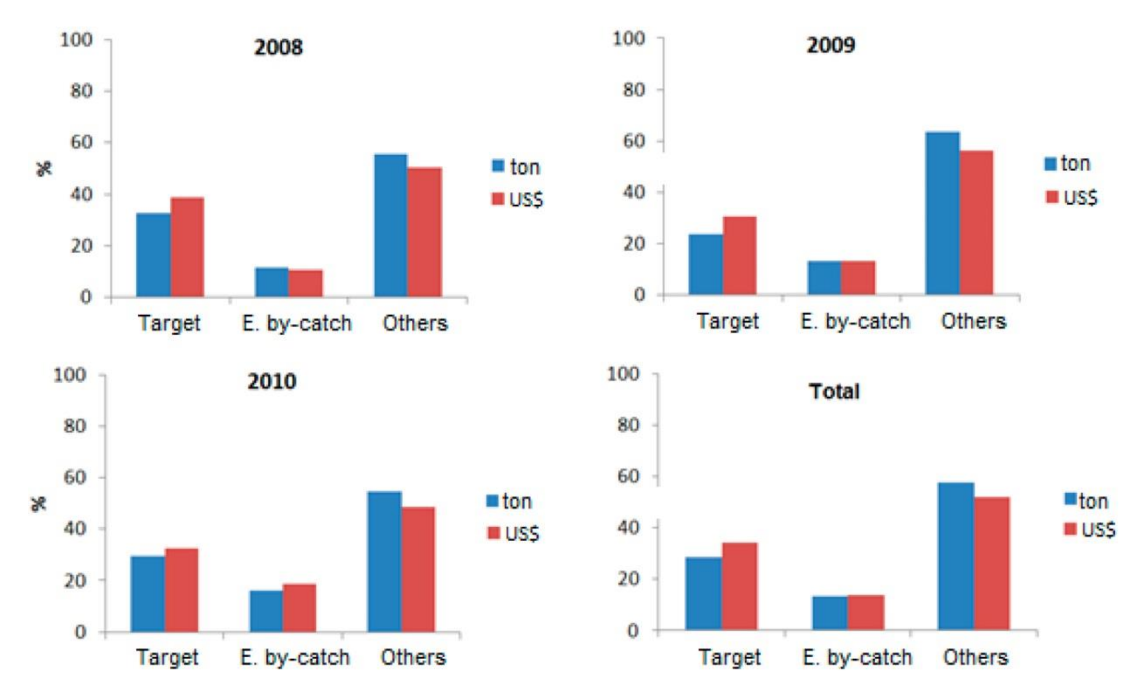


Figure 5. Contribution in weight (ton) and revenue (US$) of target and expected by-catch species as defined in the industrial double-rig demersal fishes licenses, according to landings monitored in Santa Catarina State, between 2008 and 2010. "Other" refers to species not listed in the licenses.

As demonstrated by Table 11, in spite of defining different targets (except by the Argentine red and stiletto shrimps, to be commented below), actually, a high proportion of species appear repeatedly in the three licenses examined. In combination with the same permitted fishing areas and with the absence of legally established limits for the proportion that target and predicted by-catch species can attain in landings of

Table 11. Percentage of species in common in licenses and landings of the industrial double-rig fleets of Santa Catarina State, Southern Brazil, monitored between 2008 and 2010. Pink-shrimp vessels were separated according to the catch storage method. Because licenses are the same for all pink-shrimp vessels regardless of their storage method, percentages were repeated in the table when comparing species listed in their respective licenses with the other fleets.

Fleet	Criteria							
	License				Landing			
	Pink-shrimp freezer	Pink-shrimp icing	Sea-bob shrimp	Demersal fishes	Pink-shrimp freezer	Pink-shrimp icing	Sea-bob shrimp	Demersal fishes
Pink-shrimp freezer	-	-	40.9	71.1	-	70.8	71.0	73.2
Pink-shrimp icing	-	-	40.9	71.1	70.8	-	71.0	82.4
Sea-bob shrimp	40.9	40.9	-	31.8	71.0	71.0	-	66.2
Demersal fishes	71.1	71.1	31.8	-	73.2	82.4	66.2	-

each fleet, this fact opens the possibility of vessels operate opportunistically over much the same resources, irrespective of their license type. The very high percentage of common species which were effectively landed by the different fleets during the study period confirms this (Table 11).

The inclusion of the Argentine red and stiletto shrimps as targets for all vessels pertaining both to the pink and sea-bob shrimp fleets illustrates the consequence of having species in common in different licenses. Directed catches of these species have increased mostly from the middle 1990's on, when the overcapitalized pink-shrimp fleet based in Santa Catarina started to exploit them as compensatory resources, in addition to a small-scale fleet which was already present in Rio Grande do Sul. Such fact has originated an abundant and seasonal fishery conducted on inner shelf waters extending from Southern Santa Catarina towards the border between Brazil and Uruguay (Perez *et al*., 2001; D'Incao *et al*., 2002; Valentini & Pezzuto, 2006). Maximum Sustainable Yields (MSY) of these species were estimated for Brazilian waters only by Baptista-Metri (2007), and attained 4,447.3 ton yr^{-1} and 3,579.4 ton yr^{-1} for the Argentine red and stiletto shrimps, respectively. Whereas historical landings of the first species were always below the MSY, in the case of the stiletto shrimp, it was exceeded at least in 2000, 2003, 2004, 2008 and 2009 (Baptista-Metri, 2007; Benincá, 2013). Fishing effort directed to these shrimps has been considered excessive (Baptista-Metri, 2007; Dumont & D'Incao, 2008) and concerns about the risk of recruitment overfishing of the latter species were recently raised on a study by Dumont *et al.* (2011).

As compared to other shelf and slope bottom-trawl fisheries conducted on Southeastern-South Brazilian waters, which developed a progressive multi-specific behavior, the industrial sea-bob shrimp fishery maintained a mono-specific characteristic in terms of targets, at least up to late 1990's - early 2000's (Valentini & Pezzuto, 2006). In fact, Graça-Lopes *et al.* (2002a) studied the sea-bob shrimp industrial fleet which landed in São Paulo during 1988 and found by-catch species having a much lower importance than the target in the landings. Higher proportions of other species were found only in a few situations when the production of the sea-bob shrimp declined. The present paper shows, however, that multi-specificity is also emerging in this fleet as more than a half of the its landings and revenues originated from the Argentine red and stiletto shrimps, whereas the sea-bob shrimp contributed, respectively, with only 29% and 34%.

The sea-bob shrimp stock has not been assessed since D'Incao *et al.* (2002). However, it can be argued that redirecting effort for the Argentine red and stiletto shrimps in the recent years may be a response to declining biomass observed for the species in the 1990's decade. Even considering the very seasonal availability of the two southern shrimps (Baptista-Metri, 2007) and their strong inter-annual fluctuation in abundance due to environmental causes (Dumont *et al.*, 2011), the SBS fleet reveals to be highly dependent on these "new" resources. In addition, it is noteworthy that even presenting the pink-shrimp as the main target, the pink-shrimp icing fleet has also the southern shrimps as key resources contributing, together, with 27% of the revenues and 35% of the landings.

Making the Argentine red and stiletto shrimp official targets for all vessels pertaining to the sea-bob and pink-shrimp fleets cannot be considered a precautionary measure. Given that no catch or effort limits do exist for both species in Brazil, this measure threatens not only the biological sustainability of the respective stocks, but also the economic survivorship of the vessels that currently rely on these shrimps (Tables 8, 9). In addition, declining yields as resulting from a potential overexploitation or collapse of these stocks could intensify the compensatory strategy adopted by both fleets, augmenting their overlapping and, consequently, contributing for developing additional scenarios of effort concentration over other resources.

Regarding the demersal fish vessels, three main aspects deserve attention: a) in contrary to what would be expected, the most important category in their landings was neither the target nor the incidental species, but the "others" not listed in their respective licenses; b) codling, a species pertaining to the latter category, was the main item in landing and in revenue, and c) four of the most important species for this fleet (codling, Brazilian codling, flatfish and bluewing searobin) accounted for 20% of the pink-shrimp icing landings, indicating a significant catch similarity between them. While part of the dominance of the "other" category could be explained by eventual omissions in the list of species as defined by the fishing authority, actually, most of the discrepancies result from operations conducted below the 250 m isobaths as revealed by Benincá (2013). The high proportion that slope resources as codling, Argentine hake, and monkfish accounted for in the demersal fish fleet landings (Table 10) supports this view. Exploitation of these species started in Brazil in the 2000's and were firstly developed by chartered foreign stern trawl and gillnet vessels which conducted exploratory fishing operations in the slope, and were soon replaced by domestic fleets (Perez *et al.*, 2009a, 2009b). Going deeper, out from the well-known shelf fishing grounds, this fleet confirms the opportunistic expansion of the regional industrial trawling fleets to new grounds, aiming at compensating the economic losses derived from the overexploitation of the traditional demersal resources (Perez & Pezzuto, 2006; Perez *et al.*, 2009b). Apart from increasing the range of species and areas to be exploited by the fleet, such behavior imply also in an uncontrolled fishing effort over the less abundant slope resources, whose limited biological productivity revealed to be incompatible with high mortality levels (Perez *et al.*, 2005; Perez, 2006; Haimovici *et al.*, 2006).

Interestingly, it is worth mentioning that, despite having the same licenses, the two pink-shrimp fleets behaved quite differently in almost all aspects, including, for instance, physical characteristics, mean number of days at sea and at fishing, main fishing areas, number of species landed and relative contribution in total landings and revenue. Such fact demonstrates that more than signifying only distinct strategies of catch conservation, using crushed ice of cold chambers in the pink-shrimp fishery can imply significant changes in the vessel dynamics too. While icing vessels' landings were more diverse and abundant, freezer vessels showed a lower number of species and a revenue proportionally higher, which can be explained by the predominance of pink-shrimps in their landing composition. Not depending on the limited ice durability on a tropical sea, pink-shrimp freezer vessels are able to spend nearly twice more days at fishing then pink-shrimp icing ones, retaining their catch more selectively and favoring those items with higher economic value. Consequently, it is probable that those cold-chambered vessels produce much more discards during their fishing trips than the icing ones, aiming at keeping storage space for such preferential items. Studies specially designed to investigate discards in the two fleets are necessary to verify this hypothesis.

Our results point out the high diversity of items landed by all the fleets examined in the present study as the number of species/categories recorded varied from 50 (sea-bob shrimp) to 68 (pink-shrimp icing and demersal fishes fleets). As many commercial categories figured out in the landing statistics include more than a single biological species (*i.e.*, "mixture"; "sharks"), the real number of species effectively exploited by these fleets is certainly much higher. Studying the industrial double-rig landings in São Paulo State, Graça-Lopes *et al.* (2002b) recorded 70 biological species retained by sea-bob shrimp vessels between 1990 and 1991, and 137 by the pink-shrimp vessels which operated between 1989 and 1992. Kotas (1998) reported 103 biological species landed in Santa Catarina by industrial double-rig vessels directed to pink, Argentine red, Argentine stiletto and striped soldier shrimps during fishing trips conducted from 1993 to 1994. According to Haimovici & Mendonça (1996a), double-rig trawlers operating off Rio Grande do Sul between 1992 and 1993 retained 32 biological species or genera of fishes (no data were available for invertebrates), when directing their effort to the southern shrimps and flatfishes. In spite of been possibly influenced by different methods of study, sampling effort and commercial issues, declining number of retained species from São Paulo to Rio Grande do Sul could reflect, in part, a natural expected pattern of latitudinal reduction in species diversity towards the south.

Regardless the spatial, legal and operational differences observed, the regional industrial double-rig fleets clearly develop well-established multi-specific fisheries, using non-selective apparatus in a naturally biodiverse ecosystem. Thus, focusing the licensing system in extensive lists of species catchable over large areas, does not seem reasonable or even practical given the following reasons: a) currently, excepting the mandatory use of turtle excluder devices by the Brazilian shrimp fleets (Brasil, 2004), there is no locally available technology to avoid catching species not listed in the respective permissions, imposing serious limitations to the management of those species, and putting industry and fishers over constant legal risk; b) the adoption of a permissible fishing area,

encompassing the entire southeast-south region, aggravates the situation, making it virtually impossible to eliminate spatial overlapping among fleets, and consequently, coincidence in their catch composition; c) expanding the already extended lists of species in the licenses by including more items would turn the system even more complex and questionable in both biological and operational basis; and d) even if such a procedure were adopted, enforcement would be unfeasible, since inspectors would require high taxonomic skills on an extremely diverse range of species.

As pointed out by Norse (2010), unlimited mobility as evidenced in the present study encourages sequential overfishing and reduces profitability, as declining fishing abundance near homeports compels fishermen go farther, invest in larger boats, deal with higher fuel, labor, and processing costs. Therefore, how the license system for demersal fisheries should be designed in Brazil? The solution is certainly not trivial considering the complexities involved in biological, economical, structural, legal, and operational terms. Possibly, besides reducing total effort and enhancing fishing control, the most reasonable option was pointed out by Perez *et al.* (2001) for the management of demersal and benthic resources exploited on shelf and slope grounds of the region. Instead of permitting the free operation of the fleets throughout this large area, the southeastern-south Brazil should be divided in smaller "geographical management units" (GMUs), *i.e.* spatially restrict and ecosytemically designed fishing grounds, to be defined mostly according to the spatio-temporal distribution of different stocks, bottom characteristics, depth, fleet dynamics and technical considerations. After knowing the potential for sustainable exploitation of the main (or the more vulnerable) resources inhabiting each GMU, safe levels of effort would be allocated to them, redistributing and limiting the respective number of boats authorized to operate within each unit. Vessels should be licensed fundamentally to operate: a) on a single or few management unit(s) and b) with a specific fishing method. Different from the current system where catch/landing composition is the main criteria on the licensing design, the species composition would be a natural consequence of the interaction between fishing technique and ecological characteristics of the fishing grounds. Enforcement would be feasible mostly through the national vessel monitoring program (PREPS) in order to guarantee that vessels remain operating within the GMU (s) for which they were authorized. Essentially, the system should move from a species-based to a spatial-based approach, which has been considered of high value whenever multiple uses of space and resources result in conflicts among users or among these and the environment (Pipitone, 2012). Such change in licensing approach corroborates Caddy & Seijo (2005) belief that spatial tools should gain a greater role in fishing management, even of polyvalent offshore fisheries, especially considering the low-cost represented by satellite monitoring systems in terms of monitoring, control and surveillance.

Designing of GMUs could benefit from a significant amount of studies regarding resource distribution, fishing dynamics and management of pot, long-line, trawl and gillnet fisheries for benthic/demersal species living either on the shelf as on the regional slope grounds (*e.g.,* Valentini *et al.*, 1991; Haimovici & Mendonça, 1996a, 1996b; Kotas, 1998; Perez & Pezzuto, 1998; Ávila-da-Silva *et al.*, 2001; Paiva *et al.*, 2001, 2002; Perez *et al.,* 2001, 2002a, 2002b, 2007, 2009a, 2009b; Graça-Lopes *et al.*, 2002a, 2002b; Perez & Pezzuto, 2006; Pezzuto *et al.*, 2006; Baptista-Metri, 2007; Ávila-da-Silva & Arantes, 2007; Castro *et al.*, 2007; Haimovici & Velasco, 2007; Silva, 2007; Tomás, 2007; Tomás & Cordeiro, 2007; Tomás *et al.*, 2007; Dumont & D'Incao, 2008; Alves *et al.*, 2009; Botelho *et al.*, 2009; Dallagnolo *et al.*, 2009; Pio, 2011; Valentini *et al.*, 2012; Benincá, 2013; Corrêa, 2013; Rolim, 2014). Otherwise, if adoption of such model is to be considered, determining current biomass of the several stocks, reference points, sustainable effort allocation levels, and technical measures to be implemented within the GMUs (including those designed to reduce discards) would be some of the main scientific and management challenges to be faced in the future, as most of this information is virtually inexistent, and/or strictly dependent on the proper GMU's characteristics to be determined.

Although the ideas of Perez *et al.* (2001) have been proposed for over a decade, even before the implementation of the current multi-species licensing system, results of the present study reinforce the need to consider and develop such idea as a concrete alternative, if biological sustainability, fisheries economic viability, management effectiveness and legal security of those involved in Brazilian multi-species and multi-fleet demersal fisheries are goals to be achieved.

AKNOWLEDGMENTS

We are indebted to SINDIPI (Sindicato dos Armadores e das Indústrias da Pesca de Itajaí e Região) e SINDIFLORIPA (Sindicato da Indústria de Pesca de Florianópolis) by the copies of the respective vessel's licenses, and also to the Fishing Studies Group team (GEP/UNIVALI) by collecting, processing and providing us with the corresponding landing statistics. Ana

Paula Rosso (UNIVALI) kindly produced the maps from Figure 1. The Spanish version of the Abstract was written by Dr. Dante Queirolo Palma (Pontifícia Universidad Católica de Valparaíso) to whom we are thankful. M.Sc. Ana Luísa de Souza Soares gave us assistance as to the methodology for correcting ex-vessel prices. We sincerely thank the two anonymous reviewers by the constructive suggestions that improved the quality of the manuscript. CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Ministry of Education-Brazil) funded this study (Edital Capes Ciências do Mar 09/2009, AUXPE 1141/2010-IGEPESCA Project). E.M.B. was supported by a M.Sc. scholarship granted by CAPES/PROSUP to Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UNIVALI. P.R.P. coordinates IGE-PESCA/CAPES Project and is supported by Research Grant from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Ministry of Science, Technology and Innovation-Brazil, Process 306904/2012-8).

REFERENCES

Alves, P.M.F., C.A. Arfelli & A.R.G. Tomás. 2009. Caracterização da pesca de emalhe do litoral do Estado de São Paulo, Brasil. Bol. Inst. Pesca, 35(1): 17-27.

Ávila-da-Silva, A.O. & L.H. Arantes. 2007. Análise da pesca de peixes demersais com linha-de-fundo pelas frotas do Rio de Janeiro e São Paulo de 1996 a 1999. In: C.L.D.B. Rossi-Wongtschowski, R.A. Bernardes & M.C. Cergole (eds.). Dinâmica das frotas pesqueiras comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 277-294.

Ávila-da-Silva, A.O., G.C.C. Bastos & S.L.S. Tutui. 2001. A atividade pesqueira do Estado de São Paulo: análise das capturas do biênio 1998-1999 com espinhel-de-fundo. Bol. Inst. Pesca, 27(1): 33-38.

Baptista-Metri, C. 2007. Biologia pesqueira de *Artemesia longinaris* Bate, 1888 (Decapoda, Dendrobranchiata, Penaeidae) e de *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda, Dendrobranchiata, Solenoceridae) no Sul do Brasil. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 218 pp.

Benincá, E.M. 2013. As pescarias industriais de arrasto-duplo em Santa Catarina-Brasil: dinâmica *versus* permissionamento. M.Sc. Dissertation, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 109 pp.

Botelho, M.L.L.A., A.O. Ávila-da-Silva & G.C.C. Bastos. 2009. A evolução da pesca paulista de *Lophius gastrophysus* (Miranda-Ribeiro, 1915) na margem continental da costa brasileira entre 22° e 28°S. Bol. Inst. Pesca, 35(3): 413-427.

Brasil. 1938. Decreto-lei Nº794, de 19 de outubro de 1938. [http://legis.senado.gov.br/legislacao/ListaNormas.action?numero=794&tipo_norma=DEL&data=19381019&link=s]. Reviewed: 1 April 2014.

Brasil. 1967. Decreto-lei Nº221, de 28 de fevereiro de 1967. [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/del0221.htm]. Reviewed: 1 April 2014.

Brasil, 2004. Instrução Normativa Ministério do Meio Ambiente Nº31, de 13 de dezembro de 2004. [http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=61&data=14/12/2004]. Reviewed: 8 December 2014.

Brasil. 2009. Lei Nº11.959, de 29 de junho de 2009. [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Lei/L11959.htm#art37]. Reviewed: 1 April 2014.

Brasil. 2011. Instrução Normativa Interministerial Nº10 (MPA/MMA), de 10 de junho de 2011. [http://www.mpa.gov.br/legislacaompa/instrucoes-normativas/meio-ambiente-ibama/2011]. Reviewed: 28 May 2014.

Caddy, J.F. & J.C. Seijo. 2005. This is more difficult than we thought! The responsibility of scientists, managers and stakeholders, to mitigate the unsustainability of marine fisheries. Phil. Trans. R. Soc. B., 360: 59-75.

Castro, P.M.G., M.H. Carneiro, G.J.M. Servo, C.M.D. Mucinhato & M.R. Souza. 2007. Dinâmica da frota de arrasto de parelhas do Estado de São Paulo. In: C.L.D.B. Rossi-Wongtschowski, R.A. Bernardes & M.C. Cergole (eds.). Dinâmica das frotas pesqueiras comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 60-103.

Charles, A.T. 2005. Derechos de uso y pesca responsable: limitando el acceso y la captura a través de la ordenación basada en derechos. Capítulo 6. In: K.L. Cochrane (ed.). Guía del administrador pesquero. Medidas de ordenación y su aplicación. FAO, Rome, pp. 127-155.

Corrêa, K.M. 2013. Avaliação das pescarias com redes de emalhar descarregadas no Estado de São Paulo entre 2008 e 2011. M.Sc. Dissertation, Instituto de Pesca-APTA-SAA, São Paulo, 78 pp.

Dallagnolo, R., J.A.A. Perez & P.R. Pezzuto. 2009. O ordenamento da pescaria de camarões-de-profundidade (Decapoda: Aristeidae) no sudeste e sul do Brasil. Braz. J. Aquat. Sci. Tech., 13: 31-43.

Diegues, A.C.S. 1983. Pescadores, camponeses e trabalhadores do mar. Ática, São Paulo, 287 pp.

D'Incao, F., H. Valentini & L.F. Rodrigues. 2002. Avaliação da pesca de camarões nas regiões sudeste e sul do Brasil. 1965-1999. Atlântica, 24(2): 103-116.

Doulman, D.J. 1987. Licensing distant-water tuna fleets in Papua New Guinea. Mar. Policy, 11(1): 16-28.

Dumont, L.F.C. & F. D'Incao. 2008. Distribution and abundance of the Argentinean (*Artemesia longinaris*) and red (*Pleoticus muelleri*) prawns (Decapoda: Penaeoidea) in southern Brazil during the commercial double-rig trawl fishery season. Nauplius, 16(2): 83-94.

Dumont, L.F.C., I.F. Machado & F.D'Incao. 2011. Reproductive pattern, size at first maturity and stock-recruitment relationships of the argentine stiletto shrimp (*Artemesia longinaris*, Decapoda: Penaeidae) in southern Brazil. Atlântica, 33(2): 183-199.

Fahy, E. 2008. Performance of an inshore fishery in the absence of regulatory enforcement. Mar. Policy, 32: 1037-1042.

Fundação Getúlio Vargas. 2012. Índice de Preços por Atacado do Mercado-IPA-M. [http://www.portalbrasil.net/ipa_m.htm]. Reviewed: 6 July 2012.

Graça-Lopes, R., A.R.G. Tomás, S.L.S. Tutui, E. Severino-Rodrigues & A. Puzzi. 2002a. Comparação da dinâmica de desembarques de frotas camaroeiras do Estado de São Paulo, Brasil. Bol. Inst. Pesca, 28(2): 163-171.

Graça-Lopes, R., A.R.G. Tomás, S.L.S. Tutui, E. Severino-Rodrigues & A. Puzzi. 2002b. Fauna acompanhante da pesca camaroeira no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. Bol. Inst. Pesca, 28(2): 173-188.

Haimovici, M. 1998. Present state and perspectives for the southern Brazil shelf demersal fisheries. Fish. Manage. Ecol., 5: 277-289.

Haimovici, M. & J.T. Mendonça. 1996a. Descartes da fauna acompanhante na pesca de arrasto e tangones dirigida a linguados e camarões na plataforma continental do sul do Brasil. Atlântica, 18: 161-177.

Haimovici, M. & J.T. Mendonça. 1996b. Análise da pesca de arrasto de tangones de peixes e camarões no sul do Brasil: período 1989-1994. Atlântica, 18: 143-160.

Haimovici, M. & G. Velasco. 2007. A pesca de espinhel-de-fundo no sul do Brasil em 1997 e 1998. In: C.L.D.B. Rossi-Wongtschowski, R.A. Bernardes & M.C. Cergole (eds.). Dinâmica das frotas pesqueiras comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 295-307.

Haimovici, M., A.O. Ávila-da-Silva & L.G. Fisher. 2006. Diagnóstico do estoque e orientações para o ordenamento da pesca de *Urophycis mystacea* (Ribeiro, 1903). In: C.L.D.B. Rossi-Wongtschowski, A.O. Ávila-da-Silva & M.C. Cergole (eds.). Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil: dinâmica populacional das espécies em explotação-II. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 86-94.

Harte, M. & J. Barton. 2007. Reforming management of commercial fisheries in a small island territory. Mar. Policy, 31: 371-378.

Havice, E. 2010. The structure of tuna access agreements in the Western and Central Pacific Ocean: lessons for vessel day scheme planning. Mar. Policy, 34: 979-987.

Kotas, J.E. 1998. Fauna acompanhante nas pescarias de camarão em Santa Catarina. Ibama, Brasília, 76 pp.

Miloslavich, P., E. Klein, J.M. Díaz, C.E. Hernández, G. Bigatti, L. Campos, F. Artigas, J. Castillo, P.E. Penchaszadeh, P.E. Neill, A. Carranza, M.V. Retana, J.M.D. Astarloa, M. Lewis, P. Yorio, M.L. Piriz, D. Rodríguez, Y. Yoneshigue-Valentin, L. Gamboa & A. Martín. 2011. Marine biodiversity in the Atlantic and Pacific coasts of South America: knowledge and gaps. PLoS One, 6(1): e14631.

Ministério do Meio Ambiente. 2004. Instrução Normativa Nº5 de 21 de maio de 2004. Diário Oficial da União, Seção 1, de 29 de maio de 2004, pp. 136-142. [http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?-data=28/05/2004&jornal=1&pagina=136&totalArquivos=184]. Reviewed: 9 April 2014.

Norse, E.A. 2010. Ecosystem-based spatial planning and management of marine fisheries: why and how? Bull. Mar. Sci., 86(2): 179-195.

Paiva, M.P., M.F. Andrade-Tubino & A.A.S. Menezes. 2002. Pesqueiros do camarão-rosa, *Farfantepenaeus* spp., no Estado do Rio de Janeiro (Brasil). Arq. Ciên. Mar, 35: 79-85.

Paiva, M.P., A.A.S. Menezes & M.F. Andrade-Tubino. 2001. Pescarias industriais do camarão-rosa e da fauna acompanhante no Estado do Rio de Janeiro, Brasil (1993-1997). Arq. Ciên. Mar, 34: 61-66.

Pearse, P.H. 1981. Fishing rights, regulations and revenues. Mar. Policy, 5(2): 135-146.

Perez, J.A.A. 2006. Potenciais de rendimento dos alvos da pesca de arrasto de talude do Sudeste e Sul do Brasil, estimados a partir de parâmetros do ciclo de vida. Braz. J. Aquat. Sci. Tech., 10(2): 1-11.

Perez, J.A.A. & P.R. Pezzuto. 1998. Valuable shellfish species on the by-catch of shrimp fishery in southern Brazil: spatial and temporal patterns. J. Shellfish Res., 17(1): 303-309.

Perez, J.A.A. & P.R. Pezzuto. 2006. A pesca de arrasto de talude do sudeste e sul do Brasil: tendências da frota nacional entre 2001 e 2003. Bol. Inst. Pesca, 32(2): 127-150.

Perez, J.A.A., P.R. Pezzuto & H.A. Andrade. 2005. Biomass assessment of the monkfish *Lophius gastrophysus* stock exploited by a new deep-water fishery in southern Brazil. Fish. Res., 72: 149-162.

Perez, J.A.A., R. Wahrlich & P.R. Pezzuto. 2009a. Chartered trawling on the slope off Brazilian coast. Mar. Fish. Rev., 71(2): 24-36.

Perez, J.A.A., P.R. Pezzuto, S.H. Lucato & W.G. Vale. 2007. Frota de arrasto de Santa Catarina. In: C.L.D.B.,

Rossi-Wongtschowski, R.A. Bernardes & M.C. Cergole (eds.). Dinâmica das frotas pesqueiras comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 104-163.

Perez, J.A.A., P.R. Pezzuto, A.L.S. Soares & R. Wahrlich. 2009b. Deepwater fisheries in Brazil: history, status and perspectives. Lat. Am. J. Aquat. Res., 37: 513-541.

Perez, J.A.A., R. Wahrlich, P.R. Pezzuto & F.R.A. Lopes. 2002a. Estrutura e dinâmica da pescaria do peixe-sapo *Lophius grastrophysus* no Sudeste e Sul do Brasil. Bol. Inst. Pesca, 28: 205-231.

Perez, J.A.A., P.R. Pezzuto, H.A. Andrade, P.R. Schwingel, M.R. Ribeiro & R. Wahrlich. 2002b. O ordenamento de uma nova pescaria direcionada ao peixe-sapo (*Lophius gastrophysus*) no Sudeste e Sul do Brasil. Notas Téc. da Facimar, 6: 65-83.

Perez, J.A.A., P.R. Pezzuto, L.F. Rodrigues, H. Valentini & C.M. Vooren. 2001. Relatório da reunião técnica de ordenamento da pesca de arrasto nas regiões sudeste e sul do Brasil. Notas. Téc. Facimar, 5: 1-34.

Pezzuto, P.R., J.A.A. Perez & R. Wahrlich. 2006. O ordenamento das pescarias de caranguejos-de-profundidade (*Chaceon* spp.) (Decapoda: Geryonidae) no sul do Brasil. Bol. Inst. de Pesca, 32: 229-247.

Pio, V.M. 2011. A pesca industrial de emalhe de fundo em Santa Catarina-Brasil: dinâmica, tecnologia, economia e gestão. M. Sc. Dissertation, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 117 pp.

Pipitone, C. 2012. Spatial approach to fisheries management in the Mediterranean region. Transversal workshop on spatial based approach to fishery management. Rome, pp. 6-8.

Pope, J. 2005. Controles a insumos y productos: la práctica de la ordenación de esfuerzo de pesca y captura en la pesca responsable. Capítulo 4. In: K.L. Cochrane (ed.). Guía del administrador pesquero. Medidas de ordenación y su aplicación. FAO, Rome, pp. 69-89.

Rolim, F.A. 2014. Avaliação dos padrões espaço-temporais recentes da pesca com parelhas e sua gestão no Estado de São Paulo. M.Sc. Dissertation, Instituto de Pesca-APTA-SAA, São Paulo, 96 pp.

Shen, G. & M. Heino. 2014. An overview of marine fisheries management in China. Mar. Policy, 44: 265-272.

Received: 24 June 2014; Accepted: 16 January 2015

Silva, S.O. 2007. Análise da estrutura da comunidade de peixes demersais da plataforma continental e talude superior do Sudeste brasileiro vulneráveis à pesca de arrasto-de-fundo. M.Sc. Dissertation, Instituto de Pesca-APTA-SAA, São Paulo, 86 pp.

Tomás, A.R.G. 2007. Dinâmica da frota de emalhe do Estado de São Paulo. In: C.L.D.B. Rossi-Wongtschowski, R.A. Bernardes & M.C. Cergole (eds.). Dinâmica das frotas pesqueiras comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 263-275.

Tomás, A.R.G. & R.A. Cordeiro. 2007. Dinâmica da frota de arrasto de portas do estado do Rio de Janeiro. In: C.L.D.B. Rossi-Wongtschowski, R.A. Bernardes & M.C. Cergole (eds.). Dinâmica das frotas pesqueiras comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 17-40.

Tomás, A.R.G., M.A. Gasalla & M.H. Carneiro. 2007. Dinâmica da frota de arrasto-de-portas do estado de São Paulo. In: C.L.D.B. Rossi-Wongtschowski, R.A. Bernardes & M.C. Cergole (eds.). Dinâmica das frotas pesqueiras comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil. Instituto Oceanográfico da USP, São Paulo, pp. 41-59.

Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI)/Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar (CTTMar). 2013. Boletim estatístico da pesca industrial de Santa Catarina-Ano 2012. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 76 pp.

Valentini, H. & P.R. Pezzuto. 2006. Análise das principais pescarias comerciais da região Sudeste-Sul do Brasil com base na produção controlada do período 1986-2004. Série Documentos REVIZEE-Score Sul. Instituto Oceanográfico-USP, São Paulo, 56 pp.

Valentini, H., F. D'Incao, L.F. Rodrigues & L.F. Dumont. 2012. Evolução da pescaria industrial de camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis* e *F. paulensis*) na costa Sudeste e Sul do Brasil-1968-1989. Atlântica, 34(2): 157-171.

Valentini, H., F. D'Incao, J.E. Rodrigues, J.E. Rebelo Neto & E. Rahn. 1991. Análise da pesca do camarão-rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. Atlântica, 13(1): 143-157.

Research Article

Cultivo de larvas y juveniles de almeja voladora *Euvola vogdesi* (Pteroida: Pectinidae)

Pablo Monsalvo-Spencer[1], Teodoro Reynoso-Granados[1], Gabriel Robles-Villegas[1] Miguel Robles-Mungaray[2] & Alfonso N. Maeda-Martínez[1]
[1]Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Instituto Politécnico Nacional
195 Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S., México
[2]Acuacultura Robles, S.P.R. DE R.L., Privada, Quintana Roo 4120, La Paz, B.C.S., México
Corresponding author: Teodoro Reynoso-Granados (treynoso04@cibnor.mx)

RESUMEN. El trabajo describe por primera vez el desarrollo larvario hasta juvenil de *Euvola vogdesi* y las experiencias en el cultivo larvario de esta especie. Los reproductores en acondicionamiento gonádico alcanzaron la madurez total a los 42 ± 5 días. La inducción al desove se realizó con los métodos de shock térmico (18-20°C/20 min) e inyección intragonadal de serotonina (0,3 mL a 0,25 mM). En experimentos del efecto de las temperaturas 20, 23 y 25°C en el crecimiento larvario, se obtuvo a 25°C el mayor crecimiento. A esta temperatura, los cultivos larvarios con cambios en la densidad y dieta entre 1992 y 2001 mostraron diferencias significativas en el crecimiento, logrando disminuir el tiempo de cultivo larvario de 25 días a 11 días. En la etapa de pre-engorda, los juveniles de 3,5-4,0 mm de longitud de concha, tuvieron una supervivencia de 3-5%, a los 55 ± 5 días. Los juveniles de 6-7 mm de longitud presentaron las valvas características de los adultos, después de 25-30 días.

Palabras clave: *Euvola vogdesi*, Pectinidae, desarrollo, larvas, juveniles, acuicultura.

Larval and juvenile culture of Vogde's scallop *Euvola vogdesi* (Pteroida: Pectinidae)

ABSTRACT. Our work describes embryonic, larval, and juvenile development of *Euvola vogdesi* and shows results of experimental larval culture of this species. Broodstock in the conditioning system reached total maturity of the gonad at 42 ± 5 days. Breeders were induced to spawning with thermal shock methods (18-28°C/20 min) and with intragonadal serotonin injection (0.3 mL to 0.25 mM). The experiments of temperature effect on larval growth (20, 23, and 25°C) showed that the highest growth in shell length was achieved at 25°C. Larval growth achieved in 1992, 1999, and 2001 showed significant differences. After 9 years of technical improvements to optimize larval production, we have been able to decrease culture time from 25 to 11 days from fertilization to the plantigrade stage. After metamorphosis, postlarvae developed ornamentation in the disoconch, acquiring the species typical morphology. Juveniles from 3.5-4.0 mm in length had a survival of 3-5%, at 55 ± 5 days in pre-fattening. Juveniles of 6-7 mm in length showed the characteristic valves of adults after 20-25 days of fattening.

Keywords: *Euvola vogdesi*, Pectinidae, development, larvae, juveniles, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

La almeja voladora *Euvola vogdesi* Arnold, 1906, sostuvo una importante pesquería desde 1968; en 1972 y 1987 se capturaron 4680 y 5000 ton de callo (músculo aductor) en el noroeste del Pacífico mexicano y Golfo de California; sin embargo, la pesquería de esta almeja colapsó en 2006 (SAGARPA, 2006). Esta especie alcanza una talla máxima de 100 mm de altura de concha, con un callo de 10 g de peso fresco (Peña, 2001). La almeja voladora ha sido sobreexplotada en Baja California Sur, México (Aguilar-Ruiz, 1975; Tripp-Quezada, 1985; Diario Oficial de la Federación, 2004; Félix-Pico, 2006) y algunos autores han señalado que la explotación de esta especie la tiene en peligro de extinción (Cariño & Monteforte, 2008).

Monsalvo-Spencer (1994) realizó los primeros experimentos para obtener juveniles (semillas) de almeja

Corresponding editor: César Lodeiros

voladora en laboratorio, y existen algunos trabajos sobre la recolecta de juveniles en campo (Singh-Cabanillas & Bojórquez-Verástica, 1987; Ruiz-Verdugo & Cáceres-Martínez, 1990, 1991; Tobías-Sánchez & Cáceres-Martínez, 1994), así como al cultivo en suspensión y a profundidad, empleando canastas Nestier (Rascón & Farell, 1984; Cáceres *et al*., 1989; Ruiz-Verdugo & Cáceres-Martínez, 1990, 1991). La mayoría de los cultivos realizados no trascendieron a nivel comercial, debido a la explotación de reemplazo por especies como almeja catarina *Argopecten ventricosus*, almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, almeja chiluda *Panopea generosa* y callo de hacha *Atrina maura* (Massó-Rojas, 1996; Maeda-Martínez *et al*., 2001).

Este trabajo describe por primera vez el desarrollo embrionario, larvario y juvenil de almeja voladora, y muestra las experiencias en el cultivo de larvas hasta juveniles de esta especie realizadas desde 1992 en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), La Paz, B.C.S., México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de almejas

En 1992 y 1995 los adultos de *E. vogdesi* se recolectaron mediante buceo autónomo en el estero Rancho Bueno, Bahía Magdalena, B.C.S. y en 1999 y 2001 en la Bahía de los Ángeles, B.C., México (Fig. 1). Se realizaron tres recolectas por año, en cada una se capturaron 140 almejas con madurez avanzada y madurez total (estadio III y IV, escala de Sastry, 1963), de 58 a 100 mm de longitud de concha y fueron transportados al laboratorio del CIBNOR en contenedores térmicos de 150 L, con ambiente húmedo; la temperatura se mantuvo entre 14 y 16°C utilizando hielo en bolsas. La determinación del estadio gonadal se realizó por observación directa cuando la almeja abría las valvas al sacarla del agua, sin necesidad de sacrificar al ejemplar. Las almejas maduras fueron inducidas al desove para la obtención de larvas.

Acondicionamiento gonádico e inducción al desove

El método de acondicionamiento gonádico se aplicó todos los años analizados y consistió en hacer 10 lotes de 10 almejas desovadas (estadio I). Cada lote se colocó en un contenedor rectangular de plástico de 60 L con agua marina filtrada a 1 µm, a 24 ± 1°C, salinidad de 38-40 ups, pH 7,8-8,0 y oxígeno disuelto de 6,0-6,5 mg L^{-1}. Los ejemplares se alimentaron con una mezcla de las microalgas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *C. calcitrans*, en proporción 2:1:1 respectivamente, manteniendo una concentración de $12\text{-}15\times10^4$ cel mL^{-1}. Las heces se eliminaron mediante sifón cada 24 h. El recambio de agua fue de 50% cada 72 h; utilizando un flujo de 125 mL/min/contenedor, conservando la temperatura del acondicionamiento.

En 1992 y 1995 las almejas fueron inducidas al desove con el método de shock térmico utilizando grupos de 10 almejas colocadas en contenedores de 60 L a 18 ± 0,5°C/20 min y posteriormente transferidas a otro contenedor con agua marina a 28 ± 0,5 °C/20 min; este proceso se repitió tres veces.

En 1999 y 2001 se utilizó el método de inyección intragonadal de 0,3 mL de serotonina a 0,25 mM (sulfato de creatinina 5-Hidroxytryptamina) (Sigma Co.), a cada ejemplar de los grupos de 10 almejas (Tanaka & Murakoshi, 1985).

Al ocurrir la liberación de algún tipo de gameto, por cualquiera de los dos métodos, la almeja fue cambiada a otro contenedor para separar los espermatozoides de los ovocitos. Los reproductores que liberaron ovocitos se colocaron en una canasta Nestier, suspendida en un contenedor de fibra de vidrio de 5000 L con agua marina filtrada a 1 µm y aireación moderada. Al finalizar la expulsión de ovocitos, se adicionó una mezcla de espermatozoides provenientes de varios ejemplares para fertilizarlos, utilizando una proporción espermatozoides: ovocito de 6:1 (Loosanoff & Davis, 1963).

Cultivo de larvas y juveniles

Los cultivos larvarios se basaron en las técnicas estándar para el cultivo de moluscos bivalvos (Loosanoff & Davis 1963; Walne, 1985). En la Tabla 1, se muestran cambios en la densidad, dieta, y sustrato de fijación realizados desde 1992 hasta 2001, los cuales permitieron determinar las técnicas actuales de producción larvaria.

El siguiente procedimiento se realizó en los diferentes años de cultivo: en el mismo contenedor de la fecundación se efectuó el cultivo de embriones (15 embriones mL^{-1}) por triplicado. Cuando los embriones alcanzaron el estadio larvario velíger "D" a las 22-24 h, se retuvieron y lavaron en un tamiz con malla de nylon de 45 µm y se colocaron en un tanque similar al de la fecundación, con agua filtrada y aireación moderada; en este paso se realizó un conteo de larvas utilizando cinco alícuotas de 2 mL de cada tanque de cultivo. El agua se recambió al 100% cada 48 h, las larvas se retuvieron en tamices con diferentes aperturas de mallas en función de su crecimiento (30, 45, 54, 60, 70, 85, 95, 112, 132, 140, 150, 160 y 170 µm). Posterior a cada recambio de agua se desecharon las larvas inferiores de la moda larvaria hasta su fijación. Se tomó una muestra de 20 organismos de cada estadio por tripli-

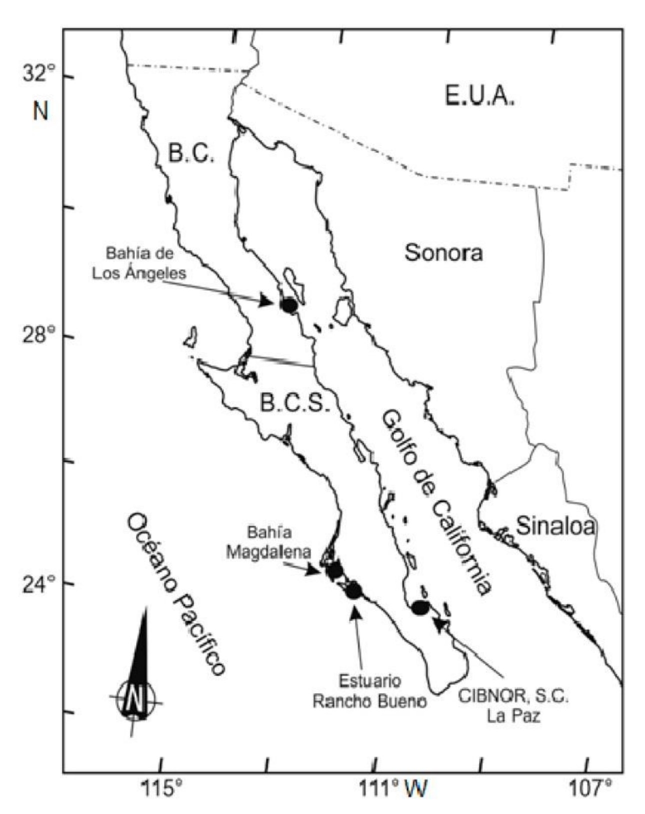


Figura 1. Localización de las áreas de colecta de almeja voladora *Euvola vogdesi.*

cado, desde embrión hasta juvenil, para la descripción del desarrollo ontogénico. Las muestras se observaron en un microscopio compuesto y/o estereoscópico para la toma de fotografías y medición del diámetro, longitud y altura en los embriones y la longitud y altura de la concha en larvas y juveniles utilizando un ocular micrométrico. Las muestras se fijaron en una solución Davidson al 4%.

Con cultivos realizados en 1992, se determinó el efecto de la temperatura a 20, 23 y 25°C en el crecimiento y supervivencia de las larvas. Las larvas se cultivaron a una densidad de 15 larvas mL^{-1}, en tanques de 1000 L de fibra de vidrio con agua de mar filtrada a 1 µm. Las larvas se alimentaron con 5×10^{4} cel mL^{-1} de *I. galbana,* durante los primeros cinco días, aumentando la concentración a 10×10^{4} cel mL^{-1} hasta la fase de asentamiento-metamorfosis. Considerando los resultados de este experimento, se eligió la temperatura en que ocurrió el mejor crecimiento y supervivencia para los cultivos larvarios de los años subsecuentes.

La dieta de los experimentos con larvas de 1992, también se aplicó a los cultivos larvarios de 1995. Posteriormente, la dieta se modificó en 1999, manteniéndose hasta el 2001, utilizando *I. galbana*, *C. calcitrans* y *C. gracilis* a las concentraciones de 2, 3 y 10×10^{4} cel mL^{-1} respectivamente, durante el cultivo larvario hasta la fijación, se siguieron los procedimientos convencionales de los criaderos de bivalvos (Di Salvo *et al.*, 1984; Pereira, 2004). En la etapa de fijación, en 1992 y 1995 se emplearon 16 bolsas cebolleras de 70×50 cm en tanques de fibra de vidrio cónicos de 500 L. En 1999 y 2001 se utilizaron 48 bolsas de nylon de 65×35 cm en tanques de igual material y forma, pero de 5.000 L.

La siguiente etapa de pre-engorda de las postlarvas, se continuó en los mismos tanques de fijación, con 4-5 postlarvas mL^{-1} en 1992, reduciéndola a 2-3 postlarvas mL^{-1} en 1999, y a 1-2 postlarvas mL^{-1} en 2001. En todos los años se alimentó con una mezcla de 1,5×10^{5} cel mL^{-1} de *I. galbana, C. calcitrans*, y *C. gracilis*, en una proporción 3:2:1, respectivamente a 25 ± 1°C, 38-40 ups, pH 7,8-8,0 y 6,0-6,5 mg L^{-1} de oxígeno disuelto. Estos parámetros se mantuvieron a lo largo de todos los años. La etapa de pre-engorda finalizó a los 55-60 días, cuando los juveniles alcanzaron la talla de 3,5-4,0 mm de longitud de la concha. Posteriormente, los juveniles se desprendieron del sustrato, se contabilizaron, incluyendo aquellas semillas fijadas en el fondo y paredes del tanque, y se transportaron al campo para su engorda.

Medición y análisis estadístico

Los datos de longitud de la concha fueron considerados para determinar el parámetro de crecimiento de larvas. Para determinar diferencias significativas ($P < 0,05$) del crecimiento larvario a las temperaturas 20, 23 y 25°C, y el crecimiento larvario de los cultivos en 1992, 1999 y 2001, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, y para comparar la homogeneidad de las medias se aplicó la prueba de Tukey. También, se determinó la tasa de crecimiento mediante los modelos de regresión exponencial.

RESULTADOS

Acondicionamiento gonádico e inducción al desove

De las 100 almejas desovadas y acondicionadas a la madurez gonadal, el 80 ± 5% de la porción femenina y el 100% de la porción masculina alcanzaron la completa madurez a 42 ± 5 días. Las almejas recolectadas con madurez avanzada (estadio III) en 15 días alcanzaron la madurez total (estadio IV). Estos resultados se obtuvieron en todos los años de experimentación. Las almejas liberaron ambos tipos de gametos con los métodos de shock térmico e inyección de serotonina. Con el shock térmico se obtuvo un desove de 65-70% de los ejemplares a 2-5 h después de la aplicación de dos ciclos. El desove de espermatozoi-

Tabla 1. Condiciones de los cultivos de larvas de almeja voladora *Euvola vogdesi*, en los años 1992, 1995, 1999 y 2001, en el laboratorio del CIBNOR, B.C.S., México. ISO: *Isochrysis galbana*, CCAL: *Chaetoceros calcitrans*, CGRA: *Chaetoceros gracilis*.

Año	Método de cultivo inducción al desove	Microalgas			Densidad		Pre-engorda Sustrato de fijación
					Inicial	Inicial	
		ISO×10^3 (cel mL^{-1})	CCAL×10^3 (cel mL^{-1})	CGRA×10^3 (cel mL^{-1})	Cultivo de larvas (velíger-D mL^{-1})	Pre-engorda (postlarvas mL^{1})	
1992	Shock térmico (18°C/20 min-28°C/20 min) Tres ciclos	50 (primeros cinco días) 100 (a partir de sexto día)			14-15	4-5	Bolsa cebollera
1995	Shock térmico (18°C/20 min-28°C/20 min) Tres ciclos	50 (primeros cinco días) 100 (a partir de sexto día)			10-12	4.5	Bolsa cebollera
1999	Inyección de serotonina en la gónada (3 mL, 0,25 mM)	30 (1-5 días de cultivo) 60 (>6 días de cultivo)	20 (1-5 días de cultivo) 40 (>6 días de cultivo)	10 (1-5 días de cultivo) 20 (>6 días de cultivo)	10	2-3	Bolsa de nylon
2001	Inyección de serotonina en la gónada (3 mL, 0,25 mM)	30 (primeros cinco días) 60 (a partir de sexto día)	20 (primeros cinco días) 40 (a partir de sexto días)	10 (primeros cinco días) 20 (a partir de sexto día)	10	1-2	Bolsa de nylon

des no fue total, al permanecer la pigmentación blanquecina en la porción testicular. Después de un periodo de reposo (15-60 min) se observó la liberación de ovocitos en forma parcial o total.

En el método de la inyección intragonadal de serotonina se obtuvo la liberación total de los espermatozoides en el 100% de las almejas. Después de un periodo de reposo de 15-45 min, se observó la liberación de los ovocitos de forma total. En los dos métodos de inducción al desove se logró una fecundación de 85-90%, y 90 ± 5% de larvas velíger "D" normales.

Cultivo experimental y producción de larvas

El tiempo de ocurrencia y morfometría de los estadios del desarrollo embrionario, larvario y juvenil de la almeja voladora *E. vogdesi* se presenta en la Tabla 2. Los siguientes cambios de la morfología corresponden al desarrollo de la especie: los ovocitos sin fecundar e hidratados son esféricos. Después de la fecundación, continuó el desarrollo característico de los moluscos bivalvos pectínidos, formándose el primer y segundo cuerpo polar de diámetro similar (Fig. 2a). Luego, ocurrió la primera división celular con la formación de dos células (blastómeros) y posteriormente la fase transitoria llamada "trébol" (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983), con dos células de igual tamaño, y un lóbulo polar de mayor diámetro (Fig. 2b). Después ocurrió la segunda división, originando cuatro células, tres de ellas de igual tamaño, y una cuarta célula de mayor diámetro (Fig. 2c). A continuación, sucedieron múltiples divisiones celulares que originaron el estadio de blástula de forma semicircular.

En la fase temprana de gástrula, ocurrió una invaginación en uno de sus extremos (polo vegetal), como un pozo poco profundo, que asemeja la forma de una silla de montar (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983) (Fig. 2d). El estadio de gástrula es semicircular, con cilios en la periferia, y movimientos rotatorios. Posteriormente, se desarrolló el primer estadio larvario denominado trocófora (Fig. 2e), de la cual se originó el estadio velíger, con una concha en forma de "D" a las 22-24 h. A partir de este estadio las larvas se alimentaron con microalgas. La concha es robusta con una pendiente relativamente elevada semicurvada, concéntrica, desvaneciéndose al resto de la concha (Fig. 2f). Conforme al crecimiento de la larva, la charnela recta de la concha, se engrosó por el desarrollo de cavidades dentadas en los extremos de la charnela. Las valvas de la concha adoptaron una forma cóncava, y se fue perdiendo la charnela recta al originarse el umbo, este estadio fue evidente en larvas de 110 µm de longitud y 128 µm de altura. En larvas de 180 µm de longitud y 209 µm de altura, se distinguieron órganos indicadores de la etapa del asentamiento y metamorfosis, como un pie rudimentario, y la mancha ocular de forma semicircular (Fig. 2g). En postlarvas de 209 µm de longitud y 246 µm de altura se inició el desarrollo de las características de la concha de esta especie por la secreción de la disoconcha en la periferia de la prodisoconcha (Fig. 2h). En una de las valvas, se inició el desarrollo de la muesca del biso en forma de canal en la disoconcha. En postlarvas de 225 µm de longitud y 315 µm de altura, la muesca del biso fue muy evidente en el extremo izquierdo de la concha, con el desarrollo de las aurículas en los extremos laterales del umbo (Fig. 2i). En organismos de 535 µm de longitud y 610 µm de altura se observaron los pliegues del manto, branquias, tentáculos y ocelos sin pigmentación. En postlarvas de 1125 µm de longitud y de 1200 µm de altura, se inició la formación de las costillas, y en aquellas de 1300 µm de longitud se completó el desarrollo de 20 costillas con un surco central fino en las valvas, ocelos con pigmentación, y las dos valvas fueron convexas.

Las postlarvas alcanzaron 3,5-4,0 mm de longitud de la concha a los 55-60 días de cultivo, se desprendieron del sustrato y se transportaron al estero Rancho Bueno, en Bahía Magdalena (Fig. 1), para su engorda en un sistema de cultivo en suspensión utilizando canastas Nestier. En el campo, el estadio juvenil se alcanzó a 6-7 mm, a 25-30 días de engorda, al diferenciarse la valva izquierda plana que encaja ligeramente en el interior de la valva derecha convexa, adquiriendo la concha la forma característica de los adultos (Fig. 2j).

El crecimiento de las larvas hasta el estadio plantígrado a temperaturas de 20, 23 y 25°C, se muestra en la Figura 3. En ninguna de las tres temperaturas fue notorio el crecimiento durante los primeros 15 días de cultivo; la supervivencia fue de 60%. Después de este tiempo, hubo un crecimiento exponencial con una supervivencia de 30% al final entre los 24-32 días de cultivo. Aunque no hubo diferencia significativa entre tratamientos ($P > 0,05$), se observó en los modelos de regresión exponencial una desigualdad en el crecimiento a 20 y 23°C, las tasas de crecimiento fueron menores con incrementos de 5,5 ± 0,5 µm día^{-1}, con un mayor tiempo de cultivo de 31 ± 1 días, en tanto que a 25°C la tasa de crecimiento fue mayor con incrementos de 7,5 ± 0,5 µm día^{-1}, con un menor tiempo de cultivo de 25 ± 1 días. En la Figura 4, se muestra el crecimiento larvario hasta el estadio plantígrado de la almeja voladora de los cultivos en 1992, 1999 y 2001, cuando ocurrieron cambios en los tratamientos de los cultivos de larvas. Se encontró diferencias significativas entre los crecimientos larvarios de los tratamientos de cada año ($P < 0,05$) y

Tabla 2. Estadios de desarrollo de almeja voladora *Euvola vogdesi* desde embrión hasta juvenil en condiciones de laboratorio a 25 ± 1°C. El tiempo 0 corresponde a la fecundación del ovocito. long: longitud. DE: desviación estándar.

Estadios de desarrollo	Tiempo	Media ± DE (µm)
Fecundación del ovocito	0	57 ± 3
Primer cuerpo polar	18-20 min	1,5
Segundo cuerpo polar	23-25 min	1,5
Primera división celular: formación de dos células (blastómeros) de igual tamaño	45-50 min	34
Fase transitoria de tres células (1) 2 células de igual tamaño; (2) un lóbulo polar de mayor tamaño)	52-55 min	(1) = 34 (2) = 38
Segunda división celular: formación de cuatro células (3) 3 células de igual tamaño; (4) una célula de mayor tamaño)	55-60 min	(3) = 27 (4) = 43
Blástula	3.0-3.5 h	57
Gástrula: cilios en la periferia	6.0-6.5 h	60 ± 3
Larva trocófora: con un flagelo apical, corona ciliar, y un mechón de cilios laterales	15-17 h	55
Larva velíger: concha con dos valvas en forma de "D"	22-24 h	43 ± 3
Larva umbada	5-6 días	110 de longitud
Larva con mancha ocular deforma ovoide de 5,0-5,5 µm de diámetro.	9-10 días	180 de longitud
Inicio del asentamiento-metamorfosis de larvas (Fijación de larvas e inicio del cultivo de post-larvas)	11-12 días	
Post-larvas con la secreción de la disoconcha	15-17 días	209 de longitud
Formación de la muesca del biso	23-25 días	
Formación de aurículas de la concha	27-29 días	225 de longitud
Pliegues del manto, tentáculos y ocelos	34-37 días	535 de longitud
20 costillas formadas	40-43 días	1300 de longitud
Post-larvas de 3,5-4,0 mm de longitud de concha (después de 50-60 días de pre-engorda en laboratorio)	70-75 días	
Juveniles de 6-7 mm de longitud de concha (concha característica de los adultos: valva derecha convexa y valva izquierda plana) (después de 25-30 días de engorda en el campo)	100-110 días	

estas diferencias también se muestran en los modelos de regresión exponencial. En los primeros cultivos larvarios de 1992 tuvieron una baja tasa de crecimiento (7,5 ± 0,5 µm $día^{-1}$), con un mayor tiempo de cultivo (25 ± 1 días) y los cultivos larvales en 2001 tuvieron una mayor tasa de crecimiento (16,5 ± 0,5 µm $día^{-1}$) alcanzando una ganancia del 41-45% en el crecimiento al disminuir el tiempo de cultivo desde la fecundación hasta el estadio plantígrado de 25 días a 11 días.

En los cultivos de pre-engorda existieron diferentes producciones de semillas entre 1992 y 2001 (Fig. 5). En 1992 se cosecharon 14.000 postlarvas (semillas). Esta cantidad aumentó ocho veces de 1995 a 2001. La supervivencia de post-larvas hasta la talla de 3,5-4,0 mm de longitud de concha fue de 3 a 5%. Las postlarvas de 6-7 mm de longitud alcanzaron el estadio juvenil, al presentar las valvas características de los adultos, después de 25-30 días de engorda en canastas Nestier en el sistema de cultivo en suspensión.

DISCUSIÓN

En México, la almeja voladora *E. vogdesi* y la almeja catarina *A. ventricosus* tuvieron analogías en la pesquería y comercialización. En la década de los 60´s, la extracción de ambas especies se combinó en los registros de captura (Félix-Pico, 2006). A partir de los 70´s, se llevó un registro de la captura de cada especie, y en 1975 se reconoció el colapso pesquero de *E. vogdesi* (Pineda-Barrera & López-Salas, 1972; Holguin, 1997). Por otra parte, los resultados de las experiencias del cultivo de la almeja catarina fueron aplicados en la acuicultura de la almeja voladora en 1992, debido a las similitudes de su biología básica (Barber & Blake, 1991). En la acuicultura de ambas especies, en la etapa de acondicionamiento gonádico, la mayoría de los reproductores alcanzan la madurez sexual en 45 días, a 25°C, cuando los reproductores de *A. ventricosus* se alimentan con *Isochrysis* sp., *Chaetoceros gracilis* y *Dunaliella tertiolecta* (Avilés &

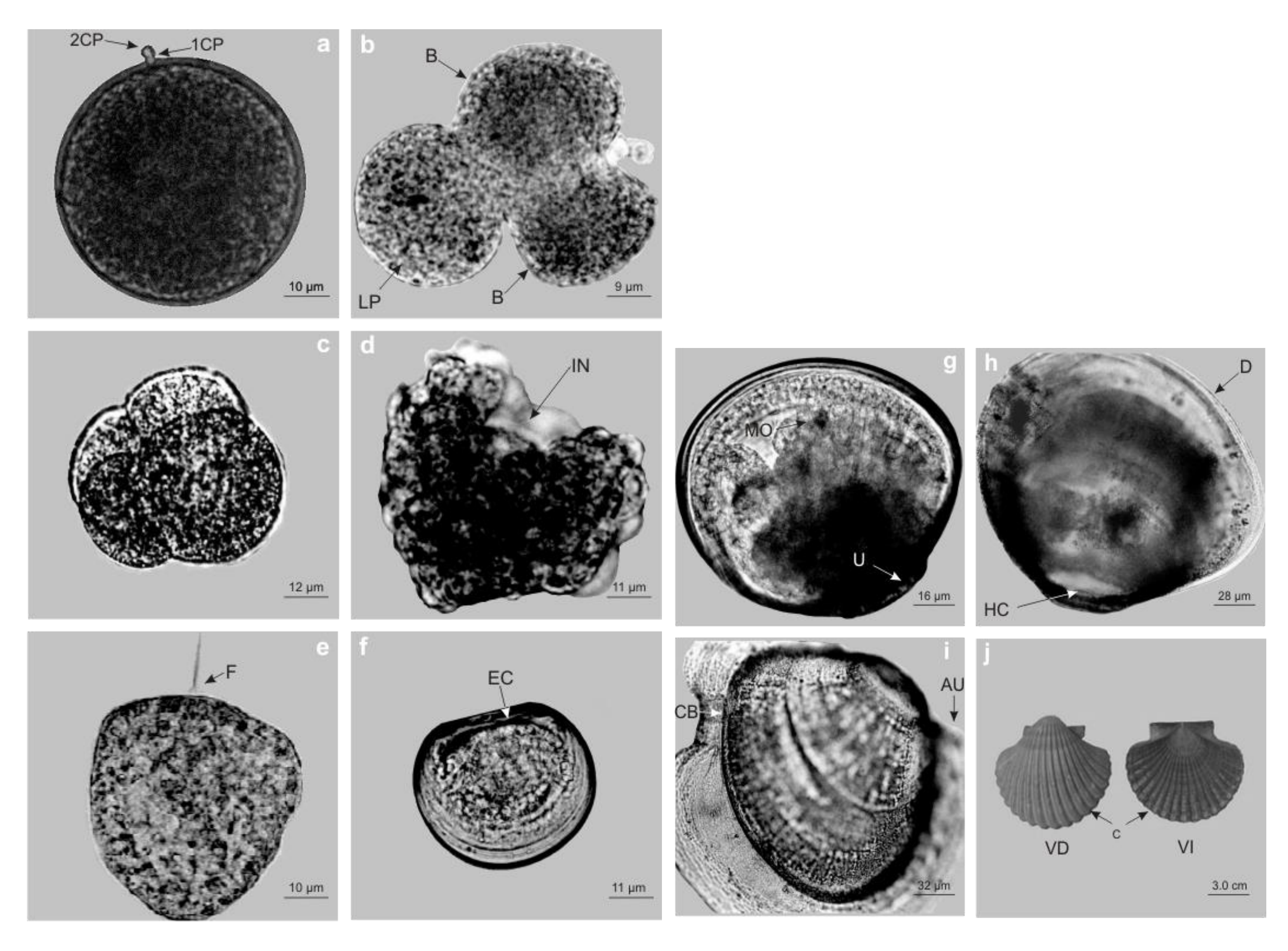


Figura 2. Estadios de desarrollo de la almeja voladora *Euvola vogdesi* a partir del ovocito fecundado hasta juvenil. a) ovocito con cuerpos polares, 1CP: primer cuerpo polar, 2CP: segundo cuerpo polar, O: ovocito, b) estadio transitorio de tres células, B: blastómero, LP: lóbulo polar, c) estadio de cuatro células, d) gástrula temprana, IN: invaginación celular, e) trocófora, F: flagelo, f) estadio velíger, EC: elevación central de las valvas bajo de la charnela, g) larva umbada, U: umbo, h) postlarva, D: disoconcha, HL: hueco de la inserción del ligamento de la charnela, i) postlarva, CB: canal de la muesca del biso, AU: aurículas de la concha, j) juvenil, C: costillas, VD: valva derecha, VI: valva izquierda.

Muciño, 1988; Robles-Mungaray & Serrano-Guzmán, 1995). En el presente trabajo, los reproductores de almeja voladora maduraron con una dieta de *I. galbana*, *C. gracilis* y *C. calcitrans*, en proporción 2:1:1 respectivamente, registrándose el 100% de supervivencia después del desove. Estos resultados, concuerdan con los obtenidos por Farías-Molina (2001), quién indica que la temperatura, cantidad y calidad del alimento son factores importantes para la madurez de la gónada, para obtener un desove exitoso y un alto índice de fecundidad en pectínidos. Las almejas catarina y voladora son hermafroditas funcionales (Barber & Blake, 1991), por lo que han tenido respuestas similares en los métodos de inducción al desove por shock térmico e inyección intragonadal de serotonina. En almeja catarina la emisión de espermatozoides ocurre con variaciones escalonadas de temperatura de 24 a 27°C en 60 min (Lora-Vilchis *et al*., 1997). Sin embargo, el método de shock térmico no es 100% eficiente ya que, en esta especie, el desove no siempre se obtiene, a pesar que las gónadas estén maduras (Monsalvo-Spencer *et al*., 1997), y se encuentren los reproductores en el periodo natural de desove. Esta respuesta también se presentó en la almeja voladora. Por tal motivo, en este trabajo se aplicó serotonina inyectada en la gónada como método efectivo para la inducción al desove. En diferentes trabajos se ha determinado la dosis de la serotonina a emplear, porque la respuesta depende de la especie (Martínez *et al*., 1996). Este es el caso de los pectínidos *Euvola ziczac* (Vélez *et al*., 1990), *A. ventricosus* (Lora-Vilchis *et al*., 1997, 2003; Monsalvo-Spencer *et al*., 1997), *A.*

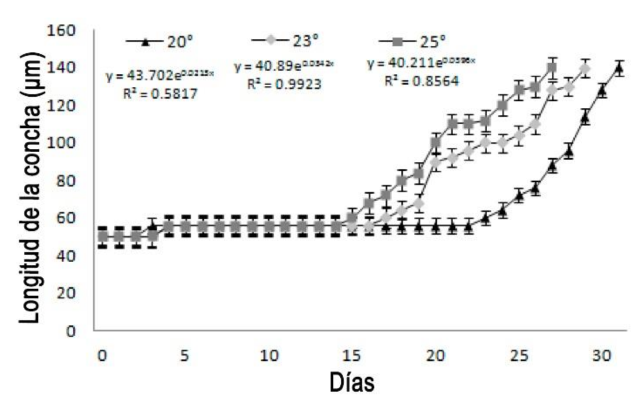


Figura 3. Crecimiento de larvas hasta el estadio plantígrado de la almeja voladora *Euvola vogdesi* a 20, 23 y 25°C en cultivo realizado en 1992.

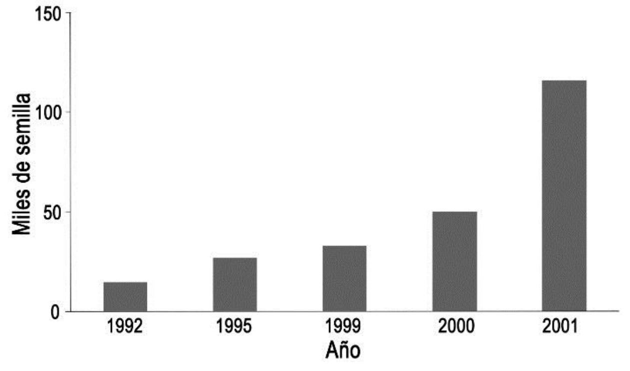


Figura 5. Producción de juveniles de 3,0-3,5 mm de longitud de concha de la almeja voladora *Euvola vogdesi* en el laboratorio del CIBNOR, S.C., La Paz, B.C.S. (Modificada de SAGARPA, 2006).

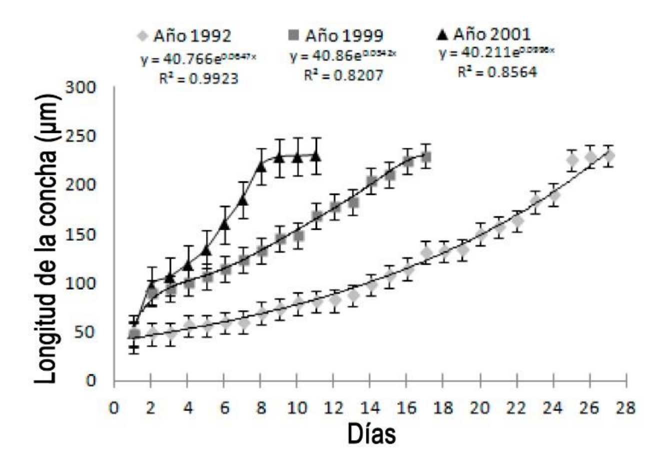


Figura 4. Crecimiento de larvas hasta el estadio plantígrado de la almeja voladora *Euvola vogdesi* a 24 ± 1°C en los años 1992, 1999 y 2001.

purpuratus y *A. irradians* (Gibbons & Castagna, 1984; Vélez *et al*., 1990; Martínez *et al.,* 1996). En la almeja catarina como en la almeja voladora, la inyección intragonadal de 0,3 mL de serotonina a concentración 0,25 mM es 100% efectiva para liberar espermatozoides, en tanto que la liberación de ovocitos ocurre como efecto secundario; posterior a esta liberación de ovocitos se vuelven a liberar espermatozoides. Esta forma de desove es un problema en las granjas de cultivo de pectínidos hermafroditas funcionales, porque es difícil separar los gametos masculinos de los femeninos para poder hacer la fecundación.

En los cultivos larvarios realizados en este trabajo, en los que se aplicó el método de shock térmico y el método clásico para la fecundación, que consiste en cuantificar los gametos obtenidos del desove para mezclarlos en una proporción óptima, resultó práctico con pocos organismos, pero no fue efectivo al incrementar el número de organismos. Este problema fue solucionado en el cultivo de la almeja catarina aplicando desoves masivos (Robles-Mungaray & Serrano-Guzmán, 1995), donde no se controla la proporción ovocito-espermatozoide, sino que se mantiene un número determinado de reproductores por volumen. Esta técnica de desove masivo es muy usada en las granjas de cultivo comerciales y se ha aplicado a una variedad de especies de moluscos bivalvos (Uriarte *et al*., 2001).

Con esta técnica, uno de los principales problemas es la polispermia, que origina el desarrollo de larvas anormales (Concha *et al*., 2011) y altas mortalidades durante los primeros días de cultivo (Avendaño *et al.*, 2001), por lo tanto, el porcentaje de larvas "D" normales es un parámetro importante de evaluación. En el presente trabajo, en 1999 y 2001 se obtuvo el ≥85% de larvas "D" normales 22-24 h, que resulta comparativamente equivalente a los reportes previos de almeja catarina (Robles-Mungaray & Serrano-Guzmán, 1995) y *Chlamys pupurata* en que este es un porcentaje adecuado a nivel comercial (Di Salvo *et al*., 1984).

En términos generales, la almeja voladora presenta los estadios característicos de la biología de desarrollo de los moluscos pectínidos y la comparación con otras especies de pectínidos permitió identificar las características morfológicas de la especie. El tamaño de los ovocitos de la almeja voladora es similar a los de *Pecten maximus*, así como la presencia de una charnela robusta por los espacios de los seudodientes en el estadio velíger (Nicolas *et al*., 1995). Como en la mayoría de los pectínidos, las características morfológicas específicas de la almeja voladora se observaron después de la metamorfosis, con la secreción de la disoconcha, cuando se fue adquiriendo la morfología del adulto, al formarse las costillas, aurículas de la concha, y el desarrollo de la concha con una valva convexa y una valva plana.

En los resultados del experimento del efecto de la temperatura en el crecimiento de larvas no se observó ningún incremento rápido en la longitud de la concha durante los primeros 15 días, esto se puede atribuir a diversos factores tales como la alta densidad larvaria (15 larvas mL^{-1}), baja cantidad (5×10^4 cel mL^{-1}) y tipo de microalgas (dieta monoespecífica). Estos efectos negativos se solucionaron aumentando la cantidad de microalgas y disminuyendo la supervivencia larvaria, favoreciendo el crecimiento exponencial a partir de 1os 15 días. En las granjas de moluscos bivalvos, el control de la temperatura, cantidad y calidad de la dieta, y densidad larval, desde el estadio embrionario hasta la etapa del asentamiento, ha permitido reducir el tiempo de cultivo de las especies con una alta supervivencia (Ibarra *et al*., 1997; Uriarte *et al*., 2001). En este trabajo, se realizaron los cultivos larvales de almeja voladora a 25°C, con dietas mixtas que son más nutritivas que las monoespecíficas (Farías-Molina, 2001), y aplicando una reducción de la densidad de 10 a 1-2 larvas mL^{-1} en la etapa del asentamiento. Esto hizo posible disminuir el tiempo de los cultivos desde la fecundación hasta el asentamiento de 25 a 11 días. También, este avance ha ocurrido en especies de pectínidos como la almeja catarina, al disminuir el tiempo de cultivo larval de 15 a 9 días (Robles-Mungaray & Serrano-Guzmán, 1995).

En los cultivos de pectínidos, en la etapa del asentamiento, generalmente se utiliza una densidad de 1-2 larvas mL^{-1} (Uriarte *et al*., 2001). En otras especies de bivalvos, como *Anadara* sp., se utiliza una densidad de hasta 5 larvas mL^{-1}, obteniendo una alta supervivencia cuando se utilizan bolsas cebolleras y de nylon (Broom, 1983; Reynoso-Granados *et al*., 1999). Abarca *et al*. (1994) reportaron que el proceso de asentamiento en pectínidos, puede retrasarse dependiendo de las condiciones del substrato. En este trabajo, en 1992 y 1995, el sustrato utilizado (bolsa cebollera) para el asentamiento no fue un problema, pues se obtuvo el 90% de fijación y 80% de supervivencia al final de la metamorfosis. Este porcentaje es considerado alto en comparación con algunas especies de pectínidos, como *P. maximus,* que presenta una supervivencia post-larval de 18% (Nicolas *et al*., 1995).

En este trabajo, el porcentaje de supervivencia de los juveniles no fue mayor de 3-5% al final de la pre-engorda, a pesar que la temperatura y cantidad de alimento se mantuvieron constantes. Este factor es negativo, ya que con el crecimiento de los juveniles la competencia por el alimento aumenta y esto no pudo ser compensado porque se mantuvo una misma concentración de alimento durante el tiempo del cultivo. Los resultados de supervivencia de juveniles de pectínidos con respecto al crecimiento, densidad y alimentación han sido descritos en diferentes trabajos, siendo evidente en *Argopecten nucleus* y *Nodipecten nodosus* (Velasco & Barros, 2008). Por otra parte, en la pre-engorda no se manipularon los organismos durante los recambios de 100% del agua. Esta medida de manejo fue positiva al impedir la fractura de la disoconcha de los juveniles evitando su mortalidad (Maeda-Martínez *et al*., 1995). También, los recambios de agua evitaron la proliferación de agentes patógenos como bacterias que pueden producir necrosis bacilar (Sainz *et al*., 1998). Por lo tanto, es necesario aplicar sistemas específicos (*e.g.*, sistema de flujo continuo, recirculación de agua) para el cultivo en etapa de pre-engorda de juveniles de la almeja voladora, para aumentar la supervivencia, como ha ocurrido en *Argopecten gibbus,* usando un sistema de flujo continuo (Sarkis, 2008) y en *A. purpuratus,* aplicando un sistema de recirculación (Merino *et al*., 2009).

En México, ya no existe demanda por parte del sector productivo de almeja voladora, debido a que existe una pesca de reemplazo en el campo con otras especies de bivalvos. Este trabajo demuestra que el cultivo de la almeja voladora puede proveer organismos para recuperar las poblaciones naturales lo que contribuirá a la conservación de la biodiversidad en el medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a César Ruíz Verdugo su apoyo en los cultivos de larvas, a Cynthia Aldana Avilés por el cultivo de microalgas, a Edilmar Cortés Jacinto y Olimpia Chong Carrillo por la revisión del manuscrito y a Diana Dorantes por la edición del texto en inglés.

REFERENCIAS

Abarca, A., Q. Medina, J. Fierro & J.C. Castilla. 1994. Descripción del proceso de asentamiento y metamorfosis en el ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en condiciones de laboratorio. Memorias XIV Jornadas de Ciencias del Mar. Universidad Austral de Chile, Puerto Montt, 65 pp.

Aguilar-Ruiz, F. 1975. Disponibilidad de almeja voladora *Pecten vogdesi* en Bahía de Los Ángeles, B.C. en primavera de 1971. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., 51 pp.

Avilés, A. & O. Muciño. 1988. Acondicionamiento gonádico y desove de *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en condiciones de laboratorio. Rev. Lat. Acuicult. Lima, 38(13): 1-120.

Avendaño, M., M. Le Pennec & M. Cantillanez. 2001. Anormalidades en larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Pectinidae), uno de los problemas en la producción artificial de semilla. Estud. Oceanol., 20: 33-42.

Barber, B. & N. Blake. 1991. Reproductive physiology. In: S.E. Shumway (ed.). Scallops: biology, ecology and aquaculure. Elsevier Science, New York, pp. 377-428.

Broom, M. 1983. Mortality and production in natural, artificially-seeded, and experimental populations of *Anadara granosa* (Bivalvia: Arcidae). Oecología, 58: 389-397.

Cáceres, M., V. Ruiz & R. De Silva. 1989. Fattening of the scallop *Pecten vogdesi* in a submarine system. Rev. Lat. Acuicult., 39: 38-444.

Cariño, M. & M. Monteforte. 2008. Del saqueo a la conservación: historia ambiental contemporánea de Baja California Sur, 1940-2003. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología, Universidad Autónoma de Baja California Sur, 778 pp.

Concha, C., E. Figueroa & F. Winkler. 2011. Asociación entre la tasa de autofecundación y la frecuencia de larvas malformadas en poblaciones cultivadas del ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Lat. Am. J. Aquat. Res., 39(2): 327-337.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2004. Segunda Sección. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, República Mexicana, 15 de marzo 2004.

Di Salvo, L.H., E. Alarcón, G. Martínez & E. Uribe.1984. Progress mass culture of *Argopecten purpuratus* with notes on its natural history. Rev. Chil. Hist. Nat., 57: 33-45.

Farías-Molina, A. 2001. Nutrición en moluscos pectínidos. In: A. Maeda-Martínez (ed.). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica. Cienc. Acuicult., 5: 89-104.

Félix-Pico, E. 2006. México. In: S.E. Shumway & G.J. Parsons (eds.). Scallops. biology, ecology and aquaculture. Developments in aquaculture and fisheries science, Elsevier, New York, pp. 1337-1367.

Gibbons, M.C. & M. Castagna. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. Aquaculture, 40: 189-191.

Holguin, Q. 1997. The collapse of scallop fishery *Euvola vogdesi* Arnold, 1906 in the Gulf of California in 1972-1973. Book of Abstracts Eleven International Pectinid Workshop 10-15 de abril de 1997, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, 137 pp.

Ibarra, A., J. Ramírez & G. García. 1997. Stocking density effects on larval growth and survival of two catarina scallop, *Argopecten vetricosus* (=*circularis*) (Sowerby II, 1842), populations. Aquacult. Res., 28: 443-451.

Loosanoff, V. & C. Davis. 1963. Rearing of bivalve mollusks. Adv. Mar. Biol., 1: 1-136.

Lora-Vilchis, M., C. Rodríguez-Jaramillo & A. Maeda-Martínez. 1997. Spawning process in the catarina scallop *Argopecten ventricosus* (=*circularis*) (Sowerby II, 1842): Histological description. Book of Abstracts, 11th International Pectinid Workshop. La Paz, B.C.S., pp. 178-179.

Lora-Vilchis, M.C., P.E. Saucedo, C. Rodríguez-Jaramillo & A. Maeda-Martínez. 2003. Histological characterization of the spawning process in the catarina scallop *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842) induced by thermal shock and serotonin injection. Invertebr. Reprod. Dev., 44: 79-88.

Maeda-Martínez, A.N., P. Monsalvo & T. Reynoso. 1995. Sistema para crianza intensiva en su etapa juvenil de almeja catarina. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, Patente Nº180212.

Maeda-Martínez, A., T. Sicard, L. Carvalho, S. Lluch-Cota & D. Lluch-Cota. 2001. Las poblaciones de almeja catarina *Argopecten ventricosus* en el Centro de Actividad Biológica de Bahía Magdalena, México. In: D. Lluch-Belda, J. Elorduy-Garay, S. Lluch-Cota & G. Ponce-Díaz (eds.). Centros de Actividad Biológica del Pacífico Mexicano. CIBNOR Ediciones, México, pp. 219-228.

Martínez, G., C. Garrote, L. Mettifogo, H. Pérez & E. Uribe. 1996. Monoamines and prostaglandin E2 as inducers of the spawning of the scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. J. Shellfish Res., 15: 245-249.

Massó-Rojas, J. 1996. Pesquería de la almeja catarina. In: M. Casas-Valdéz & G. Ponce-Díaz (eds.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Editorial CIBNOR, México, pp. 71-85.

Merino, G., E. Uribe, G. Soria & E. von Brand. 2009. A comparison of larval production of the northern scallop, *Argopecten purpuratus*, in closed and recirculating culture systems. Aquacult. Eng., 40: 95-103.

Monsalvo-Spencer, P. 1994. Acondicionamiento gonádico, desarrollo embrionario y cultivo de larvas y juveniles de almeja voladora (*Pecten vogdesi*) (Mollusca: Pectinidae). Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, CD, de México, 78 pp.

Monsalvo-Spencer, P., A. Maeda-Martínez & T. Reynoso-Granados. 1997. Reproductive maturity and spawning induction in the catarina scallop *Argopecten ventricosus* (=*circularis*) (Sowerby II, 1842). J. Shellfish Res., 16(1): 67-70.

Nicolas, L., X. Robert & L. Chevolot. 1995. Action of epinefphrine and sea water turbulence on *Pecten maximus* metamorphosis. Book of Abstracts, 10th International Pectinid Workshop. Cork, Ireland, pp. 107-108.

Peña, B.J. 2001. Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los pectínidos Iberoamericanos. In: A. Maeda-Martínez (ed.). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura, Limusa, México, pp. 1-25.

Pereira, L. 2004. Tecnología de producción de semillas de ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) en ambiente natural. Cultivo de moluscos comerciales. Segundo Curso Internacional. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, pp. 137-152.

Pineda-Barrera, J. & F. López-Salas. 1972. Prospección de la almeja voladora *Pecten vogdesi*. Instituto Nacional de Pesca, Ensenada, Boletín Informativo, 5 pp.

Rascón, C. & C. Farell. 1984. Crecimiento intermedio de dos especies de escalopa (*Argopecten circularis* y *Pecten vogdesi*) dentro de módulos de crecimiento en la Bahía de Bacochibampo, Guaymas, Son. México. Reporte de Investigación. Instituto Tecnológico y Estudios Superiores de Monterrey, Unidad Guaymas, 54 pp.

Reynoso-Granados, T., P. Monsalvo-Spencer & M. Robles-Mungaray. 1999. Efecto del sustrato y de temperatura en el asentamiento y metamorfosis de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833). Vll Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés A.C. y I. Simposium Internacional sobre el Mar de Cortés. Mayo 25-28. Hermosillo, Sonora, 14 pp.

Robles-Mungaray, M. & S.J. Serrano-Guzmán. 1995. Larval growth, survival, and spat production of *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) in a Mexican commercial hatchery. Riv. Ital. Acquacolt., 30: 187-193.

Ruiz-Verdugo, C. & C. Cáceres-Martínez. 1990. Estudio preliminar de captación de juveniles de moluscos bivalvos en la Bahía de La Paz, B.C.S. (septiembre 86 a abril 87). Invest. Mar. CICIMAR, 5(1): 29-38.

Ruiz-Verdugo, C.A. & C. Cáceres-Martínez. 1991. Experimental spat settlement of the catarina scallop, *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) and *Pecten vogdesi* (Arnold, 1906) on a filament substrate in Falsa Bay, B.C.S. In: S.E. Shumway & P.A. Sandifer (eds.). An international compendium of scallop biology and culture-atribute to James Mason-selected from the 7th international pectinid workshop, published by the World Aquaculture Society and the National Shellfisheries Association, pp. 21-27.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2006. Sexto Informe de Labores. 1 septiembre 2012, pp. 55-64.

Sainz, J.C., A.N. Maeda-Martínez & F. Ascencio. 1998. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the catarina scallop (*Argopecten ventricosus* = *circularis*) (Sowerby II, 1842). Microbiol. Ecol., 35: 188-192.

Sarkis, S. 2008. Oportunidades potenciales para la acuicultura de moluscos bivalvos en el Caribe. In A. Lovatelli, A. Farías & I. Uriarte (eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, Puerto Montt, Chile. Actas de Pesca y Acuicultura, Nº12. Roma, pp. 151-157.

Sastry, A. 1963. Reproduction 0n the bay scallop, *Argopecten irradians* Lamarck, influence of temperature on maturation and spawning. Biol. Bull. Mar. Biol., 125: 146-153.

Singh-Cabanillas, J. & G. Bojorquez-Verástica. 1987. Fijación de moluscos bivalvos en colectores artificiales en Bahía Concepción, Baja California Sur, un avance. Segundo Congreso Nacional de Acuacultura, AMAC, La Paz, B.C.S., 3 pp.

Tanaka, Y. & M. Murakoshi. 1985. Spawning induction of the hermaphroditic scallop *Pecten albicans*, by injection with serotonina. Bull. Nat. Res. Inst. Aquacult., 7: 9-12.

Tobías-Sánchez, M. & C. Cáceres-Martínez.1994. Colecta experimental de juveniles de *Pecten vogdesi* sobre diferentes sustratos artificiales en la Bahía de La Paz, B.C.S., México. Rev. Inv. Cient., (Nº Especial AMAC), UABCS, 1: 45-53.

Tripp-Quezada, A. 1985. Explotación y cultivo de la almeja catarina *Argopecten circularis* en Baja California Sur. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S., 164 pp.

Uriarte, I., G. Rupp & A. Abarca. 2001. Producción de juveniles de pectínidos iberoamericanos bajo condiciones controladas. In: A.N. Maeda-Martínez (ed.). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura. Limusa, México, pp. 147-171.

Velasco, L.A. & J. Barros. 2008. Experimental larval culture of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquacult. Res., 39: 603-618.

Vélez, A., E. Alifa & O. Azuaje. 1990. Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop *Pecten ziczac*. Aquaculture, 84: 307-313.

Verdonk, N. & J. Van den Biggelaar. 1983. Early development and the formation of germ layers. In: N. Verdonk, J. Van den Biggelaar & S. Tompa (eds.). The Mollusca, Vol.3. Development. Academic Press, Nueva York, pp. 91-134.

Walne, P. 1985. Cultivo de moluscos bivalvos: 50 años de experiencia en Conway. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 200.

Received: 20 January 2014; Accepted: 30 January 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 526-533, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-13

Research Article

Dextrose as carbon source in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a zero exchange system

Sabrina M. Suita[1], Eduardo L.C. Ballester[1], Paulo C. Abreu[2] & Wilson Wasielesky Jr.[1]
[1]Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil
[2]Instituto de Oceanografia, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil
Corresponding author: Wilson Wasielesky Jr. (manow@mikrus.com.br)

ABSTRACT. This work compared the use of dextrose and molasses as carbon sources for biofloc development, water quality maintenance, microorganism composition and growth performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in biofloc technology (BFT). Two treatments, dextrose and molasses, were tested with four replicates each. Carbon was added to achieve a C:N-AT (N-(NH_3+NH_4^+)) ratio of 6:1. Physical and chemical water quality variables were monitored daily, and shrimp growth was estimated through periodic biometry. After 30 days, survival, final biomass, and feeding conversion rate (FCR) were determined. Dissolved organic carbon, chlorophyll-*a*, floc volume, total ammonia, nitrite, nitrate and phosphate concentrations, and microorganisms (qualified by groups), were measured every three days. Water quality variables remained within acceptable levels throughout the experimental period, except for nitrite, which reached higher levels than recommended for this species. The use of dextrose resulted in higher water transparency, which influenced the remaining centric diatoms. A superior shrimp performance was observed at this treatment, presumably because of variations on the microbial community. Therefore, it is concluded that the addition of dextrose results in a superior growth performance of *L. vannamei* when cultured in BFT systems.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, bioflocs, nitrogen, microorganisms, microalgae, aquaculture.

Dextrosa como fuente de carbono en el cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en un sistema sin recambio de agua

RESUMEN. Se comparó el uso de dextrosa y melaza como fuentes de carbono en el desarrollo del biofloco, mantención de la calidad del agua, composición microbiana y crecimiento de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en sistemas de cría con tecnología de biofloco (BFT). Se probaron dos tratamientos, dextrosa y melaza, con cuatro réplicas cada uno. Se agregó carbono para mantener la relación carbono: N-AT (N-(NH_3+NH_4^+)) en 6:1. Las variables físicas y químicas de calidad del agua se controlaron diariamente y el crecimiento de los camarones se estimó mediante biometría en forma periódica. Después de 30 días se determinó la sobrevivencia, biomasa final y tasa de conversión de alimento. Cada tres días se determinaron las concentraciones de carbono orgánico disuelto, clorofila-*a*, amonio total, nitrito, nitrato y fosfato, y microorganismos (de los grupos clasificados), en el agua. Las variables de calidad de agua se mantuvieran dentro de niveles aceptables durante el periodo experimental, excepto la concentración de nitrito que alcanzó niveles superiores a los recomendados para esta especie. El uso de dextrosa mostró una mayor transparencia del agua, lo que influyó en la mayor permanencia de diatomeas céntricas. En este mismo tratamiento los camarones tuvieron un mejor crecimiento debido probablemente a variaciones en la comunidad microbiana. Por esta razón, se concluye que la adición de dextrosa proporciona un mejor crecimiento del camarón blanco *L. vannamei* cultivado en sistema de bioflocos.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, biofloco, nitrógeno, microorganismos, microalgas, acuicultura.

INTRODUCTION

Aquaculture involves a number of risk factors, which include negative impacts to sediments, salinization of water bodies, the introduction of exotic species, chemical and organic pollution, and the spread of diseases (Boyd, 2003). In superintensive aquaculture systems, the accumulation of potentially hazardous nitro-

Corresponding editor: Ronaldo Cavalli

gen products demands constant water quality monitoring. Biofloc technology (BFT) attempts to decrease or prevent the emission of effluents from aquaculture farms. Applying a source of organic carbon to the system to raise the carbon-nitrogen (C:N) proportion induces the removal of inorganic nitrogen from the culture environment. This process is driven by heterotrophic microorganisms that promote the transformation of these toxic products into microbial proteins. This process works by rapidly decreasing dissolved nitrogen concentrations in the water, transforming nitrogen into bacterial biomass (Avnimelech, 1999).

Although any carbohydrate may be used as a carbon source, sugar cane molasses is more commonly used. This product effectively controls nitrogen in the form of total ammonia (N-(NH_3+NH_4^+)) (Samocha *et al.*, 2007). Further studies are required to investigate the impacts of different carbon sources on the microbial community and biofloc formation in super intensive aquaculture environments with zero water exchange. There is also a need to determine the effects of other carbon sources on the performance of shrimp and the maintenance of water quality. Dextrose is a simple carbohydrate industrially obtained from starch (Lehninger, 1995), and is an alternative source of carbon to be used in superintensive shrimp culture systems. The use of this sugar is supposed to provide better light penetration compared to molasses, which in turn supports a more permanent phytoplankton community. Baloi *et al.* (2012) tested the performance of *L. vannamei* in biofloc system with different light intensities and found that higher light penetration may favor the permanence of microalgae in the environment, and thus it improves the performance of shrimp due to the supply of fatty acids, amino acids, and vitamins.

The goal of this study was to evaluate the use of dextrose as a carbon source for the water quality parameters, microbial community, determine its effect on the development of shrimp, and observe its effect on reduction of ammonia concentration. Each of these parameters is compared to those of molasses, the carbon source most often used for this type of culture systems.

MATERIALS AND METHODS

Postlarvae of *L. vannamei* were kept in a nursery system for 30 days. Shrimp (1.44 ± 0.33 g) were stocked in eight 163 L PVC tanks and divided into two treatments (dextrose and molasses) each with four replicates. Experimental units were individually aerated and maintained within a static system with no water recirculation and under a natural light regime. The microalgae *Thalassiosira weissflogii* was added at a density of 6 (±1) x10^4 cells mL^{-1}.

A commercial (38% crude protein) diet was supplied in feeding trays. The amount given was 7.5% of the total shrimp biomass (Jory, 2001). A stocking density of 300 shrimp m^{-2} was used. On days 15 and 30, 30 shrimp from each tank were weighed to determine growth at each treatment. Survival was determined by counting the remaining shrimp in each tank at the end of rearing period. The apparent feeding conversion rate (FCR) was calculated according to the formula: FCR = $RF/B_f - B_i$, where FCR: apparent feeding conversion rate, RF: quantity of diet supplied, B_f : final biomass, B_i: initial biomass.

Every morning dissolved oxygen concentrations (Handylab OXI/SET, Schott), temperature (mercury thermometer), pH (digital pH-meter DMpH-1, Digimed) and water transparency (Secchi disk) were monitored. Salinity was measured every two days using an optical refractometer (Atago). Alkalinity (mg L^{-1} of $CaCO_3$) was measured every three days (Strickland & Parsons, 1972). Water samples were analyzed every two days for total ammonia (N-AT(N-NH_3+NH_4^+)) (UNESCO, 1983), and every three days for nitrite (N-NO_2^-) and phosphate (P-PO_4^{-3}) (Strickland & Parsons, 1972). Nitrate (N-NO_3^-) levels were measured weekly (Strickland & Parsons, 1972). Before nutrients analysis, samples were filtered through GF50-A fiberglass filters (Schleicher & Schuell, -47 ± 0.5 mm Ø) using a vacuum pump (Diapump®). The determinations of the carbon and nitrogen contents of the diet, dextrose, molasses, and wheat bran were done using a CHN Analyzer (PerkinElemr® Series PE 2400).

The addition of organic carbon for the formation of microbial flocs was divided into two phases. During the three initial days, organic carbon was added in the form of dextrose or molasses and wheat bran in a C:N ratio of 20:1 (Avnimelech, 1999). This ratio was established by calculating the amount of nitrogen from the diet added to the system, and then determining the amount of carbon needed to achieve such ratio. Wheat bran was employed as a substrate for biofloc formation, and made up 5% of the total supplied organic fertilizers. From day 4 onwards, dextrose and molasses were added when total ammonia concentrations exceeded 1 mg L^{-1}, keeping C:N-AT at a ratio of 6:1, where 6 g of carbon are necessary to convert 1 g of nitrogen in the form of ammonia into microbial protein (Ebeling *et al.*, 2006).

The concentration of chlorophyll-*a* (Welschmeyer, 1994) was determined every three days from 50 mL samples of water filtered through GF 50-A fiberglass filters (Whatman GF/F). The extraction of chlorophyll

was carried out by dipping filters in 10 mL of 90% acetone kept in dark flasks at -12ºC. After 24 h, chlorophyll-*a* was measured using a Turner TD700 fluorometer. Dissolved organic carbon was measured in water samples three times a week using the same methodology used for chlorophyll-*a* and then analyzed using the "NPOC Analysis" (TOC-V CPH) method.

Samples of shrimp and microbial flocs were collected on the last experimental day for the measurement of the contents of crude protein, fiber, ether extract, ash, and dry matter (AOAC, 1984). The total volume of flocs (mL L^{-1}) was measured using ImHoff cones (Avnimelech, 2007). To quantify and characterize the microbial community in the water and microbial flocs, water samples were collected from each tank, fixed in 4% formalin, and stored in amber flasks. To determine bacterial abundance, the fixed samples were filtered through polycarbonate membrane filters (Nucleopore, 0.2 µm of pore and 2.5 mm of diameter) and dyed with Acridine orange at the concentration of 1 µg mL^{-1} (Hobbie *et al.,* 1977).

Images of bioflocs were captured at 1000x magnification using a camera attached to an epifluorescence microscope (Zeiss Axioplan). A set of 487709 (BP3450-490, FT510, LP520) light filters were also used. Bacteria were counted in 30 randomly chosen fields, analyzed using the software "Image tool" version 3.00. A Zeiss Axiovert inverted microscope was used at 400x magnification to count ciliates, flagellates, and microalgae. Aliquots containing 0.5 mL of water were placed in a sedimentation chamber and 50 random fields were counted (Utermohl, 1958). Microorganisms were separated into groups based on size.

Significant differences ($P \leq 0.05$) of survival, growth, and final biomass were determined using the *t*-test. Prior to the analysis of survival, data were arcsine-square root transformed. A two-way analysis of variance (ANOVA, $\alpha = 0.05$) (time × treatment) was used to detect differences of water quality parameters between treatments. All tests were conducted after the confirmation of homogeneity of variances (Lévene's test) and normality distribution of data (Kolmogorov-Smirnov's test).

RESULTS

Values of water transparency were significantly different between the treatments throughout the experimental period. Decreases in water transparency were observed in the molasses treatment after day 3, whereas for the dextrose treatment, a significant decline was seen only after day 18 (Fig. 1). Except for alkalinity, nitrite and transparency, there were no significant differences between treatments.

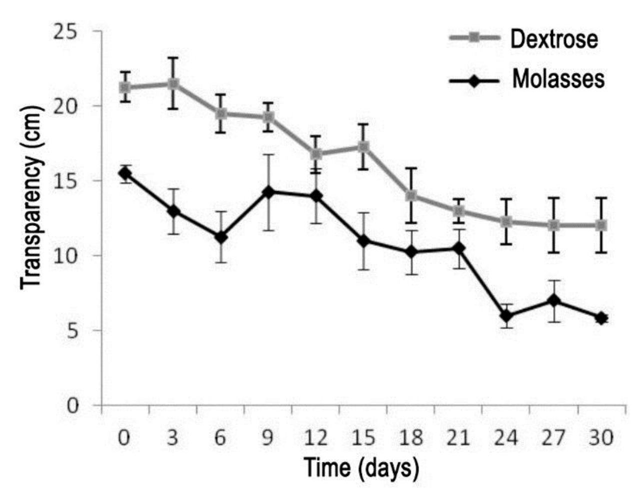


Figure 1. Mean (± SD) water transparency (cm) during the culture of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc system provided either dextrose or molasses.

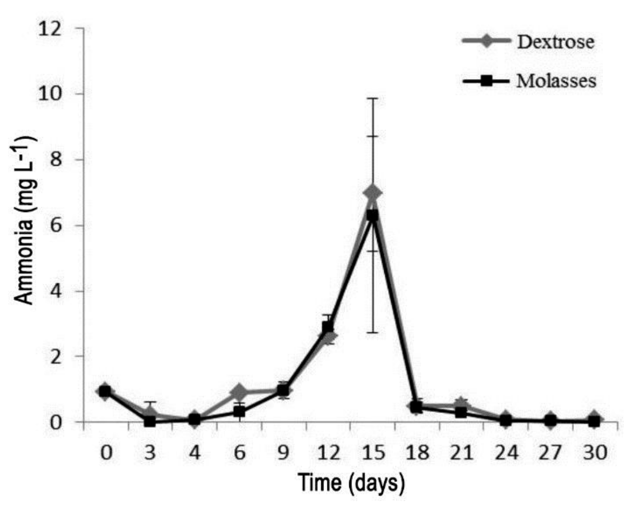


Figure 2. Mean (± SD) total ammonia concentration (mg L^{-1}) during the culture of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc system provided either dextrose or molasses.

Significant differences in alkalinity were found between treatments after day 12, with the molasses application possessing higher mean alkalinity. Alkalinity in the dextrose treatment decreased on day 12, approximately seven days earlier than in the molasses treatment.

Concentrations of ammonia were not significantly different between treatments throughout the entire study. There was a significant increase in concentration around 15th day for both treatments, followed by a decrease on 18th day, (Fig. 2). Although significant differences in nitrate were not found between the

treatments, the dextrose treatment exhibited a higher concentration (34.81 ± 22.41 mg L^{-1}) on the last experimental day than the molasses treatment (14.62 ± 11.86 mg L^{-1}).

The means for physical and chemical water parameters obtained from both treatments are shown in Table 1.

The concentrations of dissolved organic carbon (Fig. 3) were significantly different between treatments on days 9 and 15, and from day 21 onwards, there was no difference between the treatments, although dissolved carbon values were lower in the dextrose treatment. Both treatments showed a significant increase in biofloc volume on the third experimental day. By the end of the experiment, the biofloc concentrations of both treatments were very similar (Fig. 4).

The amount of crude proteins and ashes of biofloc were similar within each treatment. However, the dextrose treatment had higher levels of ethereal extract (1.6%) and 1.7% for molasses and 11.6% crude fiber for dextrose and 9.8% molasses. As concentrations of crude protein was obtained 31.40% and 31.8% for dextrose and molasses respectively, and the ash content of 47.6% and 47.8% for dextrose and molasses respectively.

The dextrose treatment produced shrimp with a larger final weight, which was statistically different from the molasses treatment. The dextrose treatment also resulted in a significantly higher final biomass value than the molasses treatment. The feeding conversion rates (FCR) were significantly lower for the dextrose treatment than for the molasses treatment (Table 2).

Although both treatments have similar microbial colonization, there was a clear distinction in quantification of the microbial community between treatments over time. On day 21, significant differences in density were observed for all groups, but the centric diatoms. However, until day 5 this group had a higher density in the dextrose treatment. In the molasses treatment, there was a positive relationship between coccoid bacteria adhered to the bioflocs and production time, while in the dextrose treatment this relationship occurred with increasing density of filamentous bacteria. The means for microorganisms of both treatments are presented in Table 3.

DISCUSSION

Bacterial metabolization of carbohydrates removes inorganic nitrogen and produces protein, forming bioflocs of different sizes. These microbial communities contain bacteria, protozoa and other microorganisms that can serve as potential prey for fish or shrimp (Samocha *et al.*, 2007). Therefore, the use of bioflocs as a natural food source may impact the survival and growth of shrimp. In diatom-rich BFT culture systems, microalgae may serve as a source of nutrients and increase shrimp growth (Abreu *et al.*, 2007). These authors reported that *Farfantepenaeus paulensis* preferentially feed on large centric diatoms.

All parameters of water quality (temperature, salinity, dissolved oxygen, and pH) remained at concentrations recommended for this species. High concentrations of ammonia can retard growth and, in extreme situations, may lead to death of shrimp (Ostrensky & Wasielesky, 1995; Lin & Chen, 2003; Li *et al.*, 2007). Nitrite is an intermediate product of the nitrification of ammonia and the denitrification of nitrate, and increases with time, possibly having a synergistic effect on ammonia. In addition, the accumulation of nitrogen can damage water quality, retard shrimp growth, increase oxygen consumption, and cause high mortality rates (Lin & Chen, 2003).

The maximum ammonia levels in this study, which varied between 6 and 7 mg L^{-1} for both treatments on day 15, may be harmful to shrimp. Nitrite remained above recommended levels for the species in both treatments. According to Van Wyk & Scarpa (1999), the maximum tolerable level of nitrite for *L. vannamei* is 1 mg L^{-1}. Although a higher nitrite concentration was observed in the molasses than in the dextrose treatment, this factor was not likely the sole cause of the low final weight and survival observed in this treatment.

High nitrification rates can affect the aquaculture system itself as the oxidation rate of ammonia may exceed that of nitrite, hence causing nitrite to accumulate in the environment. A similar process was observed in this study. Compared to other nitrogen compounds, nitrate is of least concern, because shrimp performance is affected only at concentrations above 60 mg L^{-1} (Van Wyk & Scarpa, 1999). Thus, even the maximum levels observed here (~40 mg L^{-1}) would not affect shrimp performance.

Bioflocs have a dual function as they absorb accumulated dissolved inorganic nutrients, helping to maintain water quality, and are a food source for reared organisms (Avnimelech, 1999, 2007; Hari *et al.*, 2004; Ballester *et al.*, 2010). Microbial flocs contain high levels of nutrients for the shrimp, such as proteins, fatty acids, and amino acids (Burford *et al.*, 2004). Reported levels of crude protein (about 31%) in microbial flocs by Wasielesky *et al.* (2006) and Emerenciano *et al.* (2011) are consistent to the ones found in this study (31.4% and 31.8% for dextrose and molasses, respectively). However, in this study, the lipid content

Table 1. Mean (± SD) physical and chemical variables of water quality from dextrose and molasses treatments in superintensive culture of *Litopenaeus vannamei* in biofloc systems. Different superscripts in the same row denote significant differences ($P < 0.05$).

	Dextrose	Molasses
Temperature (ºC)	26.23 ± 3.55	26.52 ± 3.56
Dissolved oxygen (mg L^{-1})	7.08 ± 0.8	7.07 ± 0.78
Salinity	34.28 ± 0.94	34.30 ± 0.93
pH	7.94 ± 0.33	7.95 ± 0.32
Alkalinity ($CaCO_3$ mg L^{-1})	126.59 ± 33.7[a]	143.86 ± 34.01[b]
Transparency (cm)	16.59 ± 3.59[a]	10.56 ± 3.19[b]
N-NH_4^+ (mg L^{-1})	1.16 ± 1.96	1.03 ± 2.01
N-NO_2^- (mg L^{-1})	14.34 ± 17.02 [a]	17.81 ± 20.82 [b]
N-NO_3 (mg L^{-1})	15.8 ± 16.84	13.32 ± 13.58
PO_4 (mg L^{-1})	1.22 ± 1.19	1.48 ± 1.2

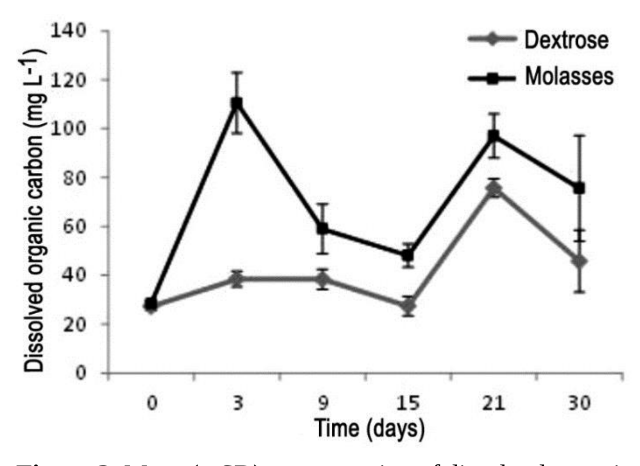


Figure 3. Mean (± SD) concentration of dissolved organic carbon (mg L^{-1}) during the super intensive culture of *Litopenaeus vannamei* in a biofloc system provided either dextrose or molasses.

of the bioflocs were considerably higher in the dextrose (1.6%) and molasses (1.4%) treatment in comparison to Wasielesky *et al*. (2006) and Emerenciano *et al*. (2011) (0.47% and 0.49% lipids, respectively). The rather high lipid concentrations observed here are likely caused by the presence of microalgae and ciliates. Microorganisms, especially diatoms, are important sources of lipids and essential fatty acids (Silva *et al*., 2008).

In this study, a higher feed conversion was observed in the dextrose treatment, indicating that shrimp prefer to feed on this type of microbial community. Again, this was probably due to the presence of a larger number of nutritious diatoms in this treatment (Silva *et al*., 2008). Results indicated that natural food is an important factor in the performance of *L. vannamei,* suggesting that the nutritional quality of the microbial community grown with organic dextrose is somehow higher. This treatment produced a higher final weight for the shrimp.

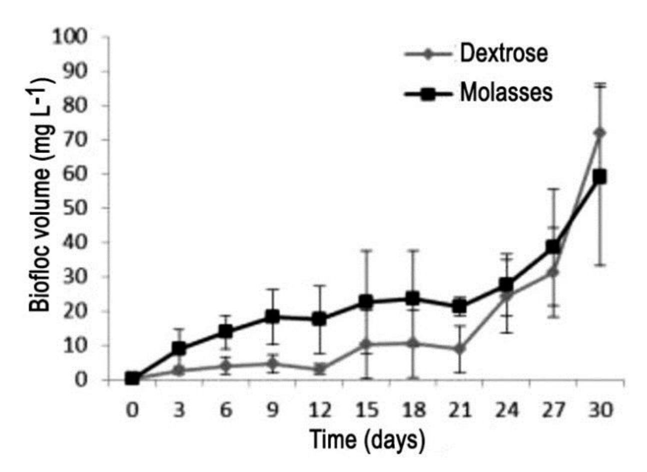


Figure 4. Mean (± SD) volume (mg L^{-1}) of microbial bioflocs during the culture of *Litopenaeus vannamei* provided either dextrose or molasses.

Table 2. Mean (± SD) survival, final weight (g), final biomass (g) and apparent feed conversion rate (FCR) in the culture of *Litopenaeus vannamei* in a static bioflocs system. Different superscripts in the same row denote significant differences ($P < 0.05$).

	Dextrose	Molasses
Survival (%)	79.11 ± 11.44	68.64 ± 7.48
Final weight (g)	3.49 ± 0.78[a]	3.06 ± 0.81[b]
Final biomass (g)	298.63 ± 24.32[a]	231.58 ± 15.54[b]
FCR	1.67 ± 0.17[a]	2.21 ± 0.14[b]

The decrease of microalgae density was probably caused by the lack of light, especially in the molasses treatment, and by shrimp grazing. The increased water transparency in the dextrose treatment was likely a property of the chemical characteristics of dextrose, which is a monosaccharide refined from starch (Lehninger, 1995). These properties allowed more light to reach microalgae in the dextrose treatment. Liquid molasses is a compound sugar (Lehninger, 1995) obtained from glucose residue, so it is less labile than dextrose. Increased water turbidity, and decreasing light penetration, may affect the growth of microalgae. Baloi *et al*. (2012) used molasses as carbon source and observed a reduced penetration of light after the second week trial. The fact that dextrose is a labile source of carbon also benefits the development of heterotrophic bacteria, because this kind of carbohydrate allows bacteria to be the first to use the inorganic nitrogen available in the medium (Ebeling *et al*., 2006). Thus, in the dextrose treatment, a greater proliferation of microalgae occurred with a simultaneous reduction of chlorophyll-*a*. This observation suggests that phytoplankton were declining, likely through predation by heterotrophic plankton and shrimp. The availability of nutrients and light decreased after the second week.

Table 3. Mean (± SD) concentration of microorganisms (ind $L^{-1}x10^{3}$) in the culture of *Litopenaeus vannamei* in a static biofloc system provided either dextrose or molasses as carbon source. Different superscripts, in the same row denote significant differences ($P < 0.05$).

Days	Dextrose			Molasses		
	9	15	21	9	15	21
Free coccoid bacteria	20700 ± 1034.7[a]	1840 ± 528.3[a]	3540 ± 917.7[a]	5700 ± 892.1[b]	8990 ± 1956.1[b]	25100 ± 2504.5[b]
Small filamentous adhered bacteria	0[a]	1810 ± 398[a]	1490 ± 491.77[a]	140.92.17[b]	1080 ± 685.55[b]	637 ± 241.31[b]
Large filamentous adhered bacteria	1510 ± 428.64[a]	0	0	400 ± 219.37[b]	0	0
Flagellates	1.64 ± 0.39[a]	2.53 ± 0.63[a]	1.2 ± 0.39[a]	4.17 ± 0.9[b]	3.46 ± 0.72[b]	1.74 ± 0.5[b]
Small ciliates	0	0.46 ± 0.3	3.18 ± 0.78[a]	0	1.05 ± 0.68	5.04 ± 0.96[b]
Large ciliates	0.67 ± 0.23[a]	0.5 ± 0.25[a]	0.29 ± 0.25[a]	4.5 ± 0.75[b]	2.44 ± 0.54[b]	1.86 ± 0.56[b]
Centric diatoms	13.4 ± 1.65[a]	7.25 ± 0.79[a]	1.03 ± 0.37	5.1 ± 0.88[b]	3.08 ± 0.14[b]	1.4 ± 0.5

The addition of dextrose and molasses on days 9, 12 and 15 at a ratio of 6:1 ($C:N-NH_4^+$) may have influenced the formation of bacterial biomass by removing ammonia from the system. This is seen in the increase in floc volume from the second week onwards, mainly in the dextrose treatment. Moreover, the reduction of ammonia on day 18 indicates that the formation of microbial flocs is caused in part by the immobilization of nitrogen compounds.

Even with the addition of organic fertilizers, a decline in the concentration of dissolved organic carbon was observed on days 9 and 15. These observations precede the immobilization of ammonia, and may be related to the action of heterotrophic organisms. Therefore, the immobilization of nitrogen may have occurred heterotrophically, through the formation of bacterial biomass, and chemo-autotrophically through the development of nitrifying bacteria.

Hari *et al*. (2004) obtained a better feed conversion rate with tapioca flour as a source of organic carbon at a C:N ratio of 20:1. This ratio seems to be effective for *L. vannamei*, cultured with microbial flocs, and has been applied in several other studies (Avnimelech, 1999; Hari *et al*., 2004; Samocha *et al*., 2007). In this study, as molasses were added, the fertilization used in phase 1 was found to be sufficient to stimulate the formation of flocs. However, the addition of dextrose increased the floc volume (from 2.93 to 10.13 mL L^{-1}) from day 15 onwards. As the conversion efficiency of ammonia did not differ between treatments, this probably occurred due the contribution of microalgae to the removal of ammonia in the dextrose treatment.

Levels of dissolved organic carbon also contribute to the development of bacteria and cyanophytes (Esteves, 1998). Bacteria are responsible for most of the uptake of N and P, and have an advantage over phytoplankton because bacteria assimilate more nutrients due to their higher surface-to-volume ratio (Kirchman, 2000). The use of different carbohydrate sources led to different values of bacterial abundance in both treatments. On day 9, the number of coccoid bacteria in the dextrose treatment was much higher than in the molasses treatment, and there was an inversion in the evolution of abundance values throughout the experiment. The decrease in number of bacteria in the dextrose treatment may represent the consumption of these microorganisms by flagellates, which in turn were consumed by ciliates, a trophic interaction typical of the Microbial Loop concept (Azam *et al*., 1983). The processes involved in the performance of the microbial community in this study seems to corroborate the claims of Zhukova & Kharlamenko (1999), who say that polyunsaturated fatty acids synthesized by ciliates and flagellates can be processed from the ingestion of bacteria, indicating the occurrence of the microbial loop.

A larger light penetration in BFT systems may improve shrimp performance, but may also result in the presence of potentially harmful organisms, such as filamentous bacteria (Ray *et al*., 2009). Small (≤20 µm) filamentous bacteria adhered to the bioflocs appeared on day 15 in the dextrose treatment, a likely result of the higher availability of phosphorus from day 9 onwards (Burford *et al*., 2003). Moreover, the growth of cyanobacteria (filamentous bacteria) may be related to the addition of dissolved organic carbon in the system (Esteves, 1998) because the abundance of these microorganisms on the last day was preceded by reductions in the levels of organic carbon, suggesting an uptake for the development of these organisms. However, the low number of small (≤20 mm) filamentous bacteria attached to the bioflocs found in the molasses treatment may have been caused by a N:P ratio harmful to cyanobacteria. This unfavorable ratio may have also promoted the dominance of coccoid bacteria, which may better assimilate nutrients because of their higher surface-to-volume ratio.

The increase in the density of small ciliates in both treatments by the end of the experiment was likely caused by a low predation by shrimp, as they were concentrated in consuming larger ciliates. Thus, there was a decrease in the abundance of large ciliates in both treatments. However, significant differences in the number of large ciliates between the treatments may be caused by a higher rate of consumption of these ciliates by shrimps, indicating a selection process.

CONCLUSIONS

The differences in the structure microbial community of the biofloc affected overall biomass production. Although the use of molasses is currently well established in BFT systems, a superior growth performance of shrimp was observed when dextrose was used as carbon source.

Albeit more expensive than molasses, the addition of dextrose results in increased water transparency, which may contribute to a higher availability of microbes for shrimp to feed on. Longer-term experiments are needed to observe the stabilization of microbial flocs and the conversion of nitrite to nitrate. Moreover, applying techniques to characterize bacterial groups may help identifying important information about microbial dynamics in BFT culture systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Fishery and Aquaculture (MPA) and Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES). Special thanks to Centro Oeste Rações S.A. (GUABI) for the experimental diets. W. Wasielesky Jr., P.C.V. Abreu and E.L.C. Ballester are research fellows of CNPq.

REFERENCES

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1984. Official methods of analysis.: Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1141 pp.

Abreu, P.C., E.L.C. Ballester, C. Odebrecht, W. Wasielesky, R.O. Cavalli, W. Graneli & A.M. Anesio. 2007. Importance of biofilm as food source for shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) evaluated by stable isotopes (d13C and d15N). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 347: 88-96.

Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture, 176: 227-235.

Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. Aquaculture, 264: 140-147.

Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L.A. Meyer-Rell & F. Thingstad. 1983. The ecological role of water- column microbes in the sea. Mar. Ecol. Progr. Ser., 10: 257-263.

Ballester, E.L.C., P.C. Abreu, R.O. Cavalli, M. Emerenciano, L. Abreu & W. Wasielesky. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. Aquacult. Nutr., 16: 163-172.

Baloi, M., R. Arantes, R. Schveitzer, C. Magnotti & L. Vinatea. 2012. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. Aquacult. Eng., 52: 39-44.

Boyd, C.E. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm- level. Aquaculture, 226: 101-112.

Burford, M.A., P.J. Thompson, R.H. Bauman & D.C. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high intensive, zero-exchange shrimp ponds in Belize. Aquaculture, 219: 393-411.

Burford, M.A., P.J. Thompson, R.P. Mcintosh, R.H. Bauman & D.C. Pearson. 2004. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. Aquaculture, 232: 525-537.

Ebeling, J.M., M.B. Timmons & J.J. Bisogni. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic control of ammonia-nitrogen in aquaculture in aquaculture production systems. Aquaculture, 257: 346-358.

Emerenciano, M., E.L.C. Ballester, R.O. Cavalli & W. Wasielesky. 2011. Effect of biofloc technology (BFT) on the early postlarval stage of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: growth performance, floc composition, and salinity stress tolerance. Aquacult. Int., 19: 891-901.

Esteves, F.A. 1998. Fundamentos de limnología. Interciência Editora, Río de Janeiro, 602 pp.

Hari, B., K. Madhusoodana, J.T. Varghese, J.W. Schama & M.C.J. Verdegem. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. Aquaculture, 241: 179-194.

Hobbie, J.E., R.J. Daley & S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol., 33: 1225-1228.

Jory, D.E. 2001. Feed management practices for a healthy pond environment. In: C.L. Browdy & D.E. Jory (eds.). The new wave. Proceedings of a special session on sustainable shrimp farming. World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 118-143.

Kirchman, D.L. 2000. Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. In: D.L. Kirchman (ed.). Microbial ecology of the oceans. Wiley-Liss, New York, 9: 261-288.

Lehninger, R.A. 1995. Principles of biochemistry. Translated by W.R. Lodi & A.A. Simões. Sarvier, São Paulo, 725 pp.

Li, E., L. Chen, Z. Zeng, X. Chen, N. Yu, Q. Lai & J.G. Qin. 2007. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities. Aquaculture, 265: 385-390.

Lin, Y. & J. Chen. 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. Aquaculture, 224: 193-201.

Ostrensky, A. & W. Wasielesky. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967). Aquaculture, 132: 339-347.

Received: 4 October 2013; Accepted: 10 February 2015

Ray, A.J., A.J. Shuler, J.W. Leffler & C.L. Browdy. 2009. Microbial ecology and management of biofloc systems. In: C.L. Browdy & D.E. Jory (eds.). The rising tide. Proceedings of the special session on sustainable shrimp farming. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, pp. 255-266.

Samocha, T.M., S. Patnaik, M. Speed, A.M. Ali, J.M. Burger, R.V. Almeida, Z. Ayub, M. Harizanto, A. Horowitz & D.L. Brook. 2007. Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vanammei*. Aquacult. Eng., 36: 184-191.

Silva, C.F., E.L.C. Ballester, J. Monserrat, L. Geracitano, W. Wasielesky & P.C. Abreu. 2008. Contribution of microorganisms to the biofilm nutrition quality: protein and lipid contents. Aquacult. Nutr., 14: 507-514.

Strickland, J.D.H & T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Bd. Canada, Bull., 167: 311 pp.

United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization (UNESCO). 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. 1983. Manual and Guides 12 Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, 53 pp.

Utermohl, H. 1958. Zur vervolkommnurg der quantitativen phytoplankton mettthodik. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol., 9: 1-38.

Van Wyk, P. & J. Scarpa. 1999. Water quality and management. In: P. Van Wyk (eds.). Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Tallahassee, pp.128-138.

Wasielesky, W., H. Atwood, A. Stokes & C.L. Browdy. 2006. Effect natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-inrtensive culture for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 258: 396-403.

Welschmeyer, N.A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll-*a* in the presence of chlorophyll-*b* and pheopigments. Limnol. Oceanogr., 39: 1985-1992.

Zhukova, N.V. & V.I. Kharlamenko.1999. Source of essential fatty acids in the marine microbial loop. Aquat. Microbiol. Ecol., 17: 153-157.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 534-538, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-14

Research Article

Total mercury in female Pacific sharpnose sharks *Rhizoprionodon longurio* and their embryos

Martín G. Frías-Espericueta[1], Francia K.G. Zamora-Sarabia[2], J. Fernando Márquez-Farías[1]
J. Isidro Osuna-López[1], Jorge Ruelas-Inzunza[3] & Domenico Voltolina[4]
[1]Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa
Paseo Claussen s/n, Mazatlán, Sinaloa, 82000, México
[2]Programa de Posgrado en Recursos Acuáticos, Facultad de Ciencias del Mar
Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. de los Deportes s/n, Ciudad Universitaria
Mazatlán, Sinaloa 82017, México
[3]Instituto Tecnológico de Mazatlán, Calle Corsario I Nº 203, Col Urias
Mazatlán, Sinaloa 82070, México
[4]Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR, P.O. Box 1132
Mazatlán, Sinaloa 82000 México
Corresponding author: Domenico Voltolina (voltolin04@cibnor.mx)

ABSTRACT. We determined the Hg content of blood, placenta and umbilical cord of 20 pregnant females of the viviparous Pacific sharpnose shark, *Rhizoprionodon longurio* and of the livers of the embryos contained in their right and left uterus, aiming to provide information on the amount of this metal offloaded during pregnancy by the mother to the embryos. Hg content varied by close or higher than one order of magnitude in all tissues and showed the decreasing trend: maternal blood > umbilical cord > placenta > embryonic livers, with placenta and embryonic livers significantly lower than maternal blood. There were highly significant correlations ($P < 0.001$) between the Hg content of maternal blood, cord, and placenta. Those between embryonic livers and maternal blood, cord and placenta were not significant ($P > 0.05$). The results suggest transplacental Hg transfer and that the liver is not the main site of Hg accumulation.

Keywords: mercury, maternal offloading, shark embryos, blood, placenta, umbilical cord.

Mercurio total en hembras del tiburón bironche, *Rhizoprionodon longurio* y en sus embriones

RESUMEN. En el presente estudio se determinó el contenido de mercurio en la sangre, placenta y cordón umbilical de 20 hembras del tiburón bironche *Rhizoprionodon longurio* así como en el hígado de los embriones de los úteros derecho e izquierdo, con el objetivo de proveer información sobre la cantidad de este metal transferida por la madre a sus embriones durante su desarrollo. Los contenidos de Hg variaron hasta un orden de magnitud en todos los tejidos y presentaron el siguiente orden decreciente: sangre materna > cordón umbilical > placenta > hígado de los embriones. Los contenidos de la placenta y el hígado de los embriones fueron significativamente menores al determinado en la sangre materna. Se encontraron correlaciones altamente significativas ($P < 0{,}001$) entre el contenido de Hg de la sangre materna, cordón y placenta, mientras que las calculadas entre hígado de los embriones y la sangre materna, cordón y placenta no fueron significativas ($P > 0{,}05$). Los resultados sugieren que existe una libre transferencia de Hg y que el hígado no es el sitio principal de acumulación de Hg.

Palabras clave: mercurio, transferencia materna, embriones de tiburones, sangre, placenta, cordón umbilical.

Corresponding editor: Ricardo Prego

INTRODUCTION

Atmospheric transport and deposition are considered the main sources of Hg pollution, although industrial and urban wastes, mining, and agriculture are other important sources of Hg contamination of the aquatic environment (Harris *et al.*, 2012). This has a high environmental cost, because it entails lower availability of recreational areas, loss of biodiversity and of access to natural food products for human consumption, and adverse health effects (Bellanger *et al.,* 2013).

Along the food web, Hg excretion is generally lower than its absorption, and because of its progressive accumulation, this metal may reach high concentrations in the tissues of top predators (McMeans *et al.*, 2015). This may explain the levels of Hg close or above the precautionary limits for human consumption detected in Mexican Pacific sharks (Escobar-Sánchez *et al.*, 2011; Hurtado-Banda *et al.*, 2012). This is a source of concern for human health and for the conservation of these species, because the pregnant mothers of viviparous sharks transfer to their embryos the toxic substances accumulated in their organs and tissues (Lyons & Lowe, 2013; Mull *et al.*, 2013; Olin *et al.*, 2014).

In mammals, maternal blood supplies oxygen and nutrients to developing embryos, but it is also the source of their exposure to contaminants (Leino *et al.*, 2013) since, although the placenta may act as at least a partial barrier against Cd (Gundacker & Hengstschläger, 2012), Pb and Hg can readily cross this barrier (Gupta, 2012). Some results seem to show that embryos concentrate maternal blood-borne Hg, suggesting that they act a route of discharge of the excessive load of maternal mercury (Rudge *et al.*, 2009).

In placental sharks, yolk sac and stalk become progressively modified into placenta and umbilical cord, with gas exchange and hematrophic functions similar to those of mammals. These shared basic maternal-fetal relationships seem to indicate convergent evolution of the two groups (Haines *et al.*, 2006), with possible shared aspects of other functions of this organ such as acting as transport site or as partial barrier to some metals.

An important component of the winter landings of the artisanal fishing fleets of the Mexican Pacific NW is the sharpnose shark *Rhizoprionodon longurio*, which is a highly migratory placental viviparous species (Corro-Espinosa *et al.,* 2011). In this work, we evaluated the Hg content of blood and placenta of pregnant *R. longurio* females and of the liver of their respective embryos, to provide information on the mother to embryo transfer of Hg in this species, which might be an important mechanism of impaired reproductive success.

MATERIALS AND METHODS

Pregnant sharpnose sharks (20), obtained between January and March 2012 from local fishermen of Mazatlán (SE Gulf of California), were measured (total length, TL), and dissected in the laboratory with a stainless steel knife to obtain placenta and umbilical cord from the females and the liver of the embryos of both uteri. Blood (30 mL) was drawn from the ventral portion of females (Cizdziel *et al.,* 2003) using sterile plastic syringes, and immediately placed in polyethylene tubes. All tissues were lyophilized for 72 h and homogenized in a Teflon mortar. Three samples of each tissue were digested at 130°C in a mod-block unit, using sealed Teflon vessels with 5 mL of concentrated HNO_3 (trace metal grade). After digestion, samples were transferred to vials and diluted to 15 mL with Milli-Q water (Frías-Espericueta *et al.*, 2014).

All materials used during sampling and metal analysis were acid washed. Total Hg was determined by cold vapor atomic absorption spectrophotometry (CV-AAS) after reduction with $SnCl_2$ in a mercury analyzer (Buck Scientific). Certified reference material (DORM 3, National Research Council Canada) was used to assess the accuracy of the method, with a recovery of 105%, and blanks were included using the same procedure of the samples to check possible contamination. The limit of detection was 0.01 μg g^{-1} and the coefficient of variation was <10%.

The non-compliance with parametric assumptions led to employment of Mann-Whitney's tests to compare the mean Hg content of the livers of the embryos of the two uteri of each female. Since no significant differences were detected between uteri, the mean Hg content of the livers of all embryos obtained from each female was used for statistical comparisons between tissues, using non-parametric block ANOVA (Friedman´s) and Dunn's multiple comparison tests. Possible relations between the Hg values found in the tissues of mothers and embryos were determined with Spearman´s correlations tests. (ρ). All tests were with $\alpha = 0.05$ (Zar, 1999).

RESULTS

Each female, with TLs ranging from 99.8 to 118.1 cm (mean 107.5 ± 4.9 cm), carried 4 to 11 embryos. The total number of embryos obtained from the 20 females was 168. Their TLs varied between 26.38 and 34.25 cm, and there was no significant difference in mean size between the mean values of right and left uterus-borne embryos (29.46 ± 2.53 and 29.75 ± 2.52 cm, respectively).

The Hg concentrations ranged between 0.16 and 1.97 µg g^{-1} dry weight in maternal blood and from 0.10 to 0.72 and 0.06 to 0.71 µg g^{-1} in cord and placenta, respectively. The mean values were 0.54 ± 0.52, 0.32 ± 0.17 and 0.20 ± 0.15 µg g^{-1}, with a significant difference ($P < 0.05$) between blood and placenta, but not between blood and cord (Table 1). In embryonic livers total Hg ranged from 0.02 ± 0.01 to 0.16 ± 0.08 (right uterus) and between 0.04 ± 0.03 and 0.14 ± 0.02 µg g^{-1} (left uterus), and their global mean value was significantly lower than those of blood and cord, but not of the mean content of the placenta (Table 1).

There were significant correlations between the Hg content of blood and placenta (ρ = 0.943), blood and cord (ρ = 0.847), and between cord and placenta (ρ = 0.778), but the mercury contents of embryonic livers were not significantly related ($P > 0.05$) to the respective female tissues (Table 2). Additionally, there was no significant correlation between the Hg content of the embryonic livers with size and weight of the embryos (ρ = 0.005 and -0.1308, respectively, $P > 0.05$ in both cases) nor between total length of females with the respective blood Hg content (ρ = 0.231, $P > 0.05$).

DISCUSSION

The greatest maternal offloading of contaminant occurs during the first reproductive event, when the loads of contaminants accumulated by the mother are at their highest values (Lyons & Lowe, 2013). The mean TL of the pregnant mothers indicates ages close to 8-10 years, and the smallest was 99.8 cm, which is reached at 4 to 5 years of age (Castillo *et al.*, 1996). This indicates that none was primiparous, since the mean size at first maturity of this species is close to 93 cm (Corro-Espinosa *et al.*, 2011).

Several authors found a significant relation between the Hg content of fish species and their TL, age or weight (Adams *et al.*, 1999; Farkas *et al.*, 2001). This does not correspond to our results, possibly because of the low variability in size of our specimens, as well as the fairly wide range of blood Hg concentrations. On the other hand, the good correlations between Hg contents of blood, cord and placenta coincide with the general agreement that blood Hg concentration is strongly related to the Hg content of the remaining tissues (Cizdziel *et al.*, 2003; Schmitt & Brumbaugh,

Table 1. Mean Hg concentrations in µg/g, dw (± standard error) in blood, cord and placenta of 20 pregnant *Rhizoprionodon longurio* and of the livers of the respective embryos of the right (RU) and of the left (LU) uterus.

Female	Blood	Cord	Placenta	RU	LU
1	0.26 ± 0.01	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.00	0.16 ± 0.08	0.11 ± 0.02
2	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.01
3	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.08 ± .03
4	0.47 ± 0.01	0.37 ± 0.07	0.26 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01
5	0.37 ± 0.05	0.20 ± 0.06	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01
6	1.65 ± 0.21	0.72 ± 0.15	0.45 ± 0.03	0.09 ± 0.05	0.09 ± 0.01
7	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.09	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.01
8	1.27 ± 0.01	0.71 ± 0.15	0.33 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02
9	0.22 ± 0.00	0.21 ± 0.14	0.07 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.01
10	0.36 ± 0.02	0.31 ± 0.11	0.11±0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
11	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.07	0.20 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
12	0.50 ± 0.00	0.25 ± 0.09	0.13 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05
13	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.31	0.15 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
14	1.97±0.41	0.57 ± 0.13	0.71 ± 0.13	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.02
15	1.04 ± 0.16	0.34 ± 0.10	0.26 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.05
16	0.33 ± 0.01	0.29 ± 0.16	0.15 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.05 ± 0.01
17	0.26 ± 0.00	0.20 ± 0.08	0.16 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
18	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.03
19	0.32 ± 0.01	0.27 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.07
20	0.23 ± 0.00	0.32 ± 0.10	0.13 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.06
Mean*	0.54 ± 0.52a	0.32 ± 0.17ab	0.20 ± 0.15bc	0.08 ± 0.04c	

*Total mean values of blood, cord, placenta and embryonic livers ± standard deviations. Equal or common letters indicate lack of significant differences (Friedman's and Dunn's tests, α = 0.05; cd≤c≤bc≤ab and d<a).

Table 2. Spearman's correlation coefficients (ρ) between the Hg contents of tissues of females and embryos.

Relation	ρ	*P*
Placenta/blood	0.943	<0.001
Cord/blood	0.847	<0.001
Placenta/cord	0.778	<0.001
Embryonic liver/blood	0.107	>0.05
Embryonic liver/cord	0.117	>0.05
Embryonic liver/placenta	0.126	>0.05

2007). Among its several functions, blood distributes the products of digestion to all body tissues and carries metabolic wastes to the organs in charge of their excretion. This relation has been described also in humans (Ask *et al.*, 2002; Rudge *et al.*, 2009), although in these cases the Hg contents of cord or placental blood were higher than that of maternal blood.

The similar Hg contents of the embryonic livers obtained in right and left uterus confirm the lack of inter-uterine difference determined in other sharks by Adams *et al.* (1999), which was postulated by Frías-Espericueta *et al.* (2014) for other metals in the case of this species.

The sequence of progressively decreasing mean Hg concentrations of blood, cord, placenta and the lack of a significant difference between placenta and embryonic livers might indicate that the placenta acts as a partial barrier to transfer of toxic substances from mother to embryos. It also shows the existence of transplacental Hg transfer, possibly due to molecular mimicry with methionine of MeHg bound to thiol-groups (Ballatori, 2002). The content of the cord, intermediate between maternal blood and placenta, might therefore be due to the Hg fraction carried by maternal blood but not retained by the embryos, and possibly enriched by the embryos unloading their excess Hg to the mother.

There are many examples of higher Hg concentrations in fish liver tissues (Romeo *et al.*, 1999; Mieiro *et al.*, 2009; Guilherme *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2012), but a lower Hg liver content was observed in several fish species including sharks (Cizdziel *et al.*, 2003; Kenšová *et al.*, 2010; Lyons & Lowe, 2013). This difference coincides with the results obtained by Pethybridge *et al.* (2010) and Le Bourg *et al.* (2014) in embryos of placental and aplacental sharks, and is probably due to a lower content of inorganic than organic Hg, which has a high degree of affinity for the thiol groups of the muscle tissues (Soares *et al.*, 2011).

In placental viviparous sharks, mercury transfer from mother to embryos is considered a detoxification mechanism of the mother (Adams *et al.*, 1999), similar to the maternal offloading of organic pollutants described by Mull *et al.* (2013) and Olin *et al.* (2014) in the white shark *Carcharodon carcharias* and the bull shark, *Carcharhinus leucas*, respectively. Our results confirm that the placenta of the Pacific sharpnose shark *Rhizoprionodon longurio* is not an effective barrier to Hg transfer, which might be of concern because Hg might affect the normal embryonic development. This should be the focus of future studies concerning this, as well as other viviparous shark species.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by PROFAPI 2011/060, PROMEP 103.5/ 13/9354 and CONACYT INFRA-2012-01-188029 grants. C. Ramírez helped in bibliographic search and C. Monroy in sampling.

REFERENCES

Adams, D.H., J.R. McMichael & H. Robert. 1999. Mercury levels in four species of sharks from the Atlantic coast of Florida. Fish. Bull., 97: 372-379.

Ask, K., A. Åkesson, M. Berglund & M. Vahter. 2002. Inorganic mercury and methylmercury in placentas of Swedish women. Environ. Health Persp., 110: 523-526.

Azevedo, J.S., J.E. de Souza-Sarkis, T.A. Oliveira & T. Ulrich. 2012. Tissue-specific mercury concentrations in two catfish species from the Brazilian coast. Braz. J. Oceanogr., 60: 211-219.

Ballatori, N. 2002. Transport of toxic metals by molecular mimicry. Environ. Health Persp., 110: 696-694.

Bellanger, M., C. Pichery, D. Aerts, M. Berglund, A. Castaño, M. Čejchanová, P. Crettaz, F. Davidson, M. Esteban, M.E. Fischer, A.E. Gurzau, K. Halzlova, A. Katsonouri, L.E. Knudsen, M. Kolossa-Gehring, G. Koppen, D. Ligocka, A. Miklavčič, M.F. Reis, P. Rudnai, J.S. Tratnik, P. Weihe, E. Budtz-Jørgensen & P. Grandjean. 2013. Economic benefits of methylmercury exposure control in Europe: monetary value of neurotoxicity prevention. Environ. Health, 12: 3 doi: 10.1186/1476-069X-12-3.

Castillo, L., F. Márquez, J. Uribe, R. Bonfil, D. De Anda, R. Vélez & D.O. Mendizábal. 1996. La pesquería de tiburón en México. In: Pesquerías relevantes de México, Instituto Nacional de Pesca, México, pp. 365-415.

Cizdziel, J., T. Hinners, C. Cross & J. Pollard. 2003. Distribution of mercury in the tissues of five species of freshwater fish from Lake Mead, USA. J. Environ. Monit., 5: 802-807.

Corro-Espinosa, D., J.F. Márquez-Farías & A. Muhlia-Melo. 2011. Size at maturity of the Pacific sharpnose

shark *Rhizoprionodon longurio* in the Gulf of California, Mexico. Cienc. Mar., 37: 201-214.

Escobar-Sánchez, O., F. Galván-Magaña & R. Rosíles-Martínez. 2011. Biomagnification of mercury and selenium in blue shark *Prionace glauca* from the Pacific Ocean off Mexico. Biol. Trace Element Res., 144: 550-559.

Farkas, A., J. Salánki, A. Specziár & I. Varanka. 2001. Metal pollution as health indicator of lake ecosystems. Int. J. Occupat. Med. Environ. Health, 14: 163-170.

Frías-Espericueta, M.G., N.G. Cárdenas-Nava, J.F. Márquez-Farías, J.I. Osuna-López, M.D. Muy-Rangel, W. Rubio-Carrasco & D. Voltolina. 2014. Cadmium, copper, lead, and zinc concentrations in female and embryonic Pacific sharpnose shark (*Rhizoprionodon longurio*) tissues. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 93: 532-535.

Guilherme, S., M.E. Pereira, M.A. Santos & M. Pacheco. 2010. Mercury distribution in key tissues of caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. In: N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C.M. Barroso, H. Iwata & S. Tanabe (eds.). Interdisciplinary studies on environmental chemistry-biological responses to contaminants. Terrapub, Tokio, pp. 165-173.

Gundacker, C. & M. Hengstschläger. 2012. The role of the placenta in fetal exposure to heavy metals. Wien Med. Wochenschr., 162: 201-206.

Gupta, R.C. 2012. Veterinary toxicology. Basic and clinical principles, Academic Press, Waltham, 1250 pp.

Haines, A.N., M.F. Flajnik & J.P. Wourms. 2006. Histology and immunology of the placenta in the atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. Placenta, 27: 1114-1123.

Harris, R., C. Pollman, W. Landing, D. Evans, D. Axelrad, D. Hutchinson, S.L. Morey, D. Rumbold, D. Dukhovskoy, D.H. Adams, K. Vijayaraghavan, C. Holmes, R.D. Atkinson, T. Myers & E. Sunderland. 2012. Mercury in the Gulf of Mexico: sources to receptors. Environ. Res., 119: 42-52.

Hurtado-Banda, R., A. Gomez-Alvarez, J.F. Márquez-Farías, M. Cordoba-Figueroa, G. Navarro-García & L.A. Medina-Juárez. 2012. Total mercury in liver and muscle tissue of two coastal sharks from the Northwest of Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 88: 971-975.

Kenšová, R., O. Čelechovská, J. Doubravová & Z. Svobodová. 2010. Concentrations of metals in tissues of fish from the Věstonice reservoir. Acta Vet. Brno, 79: 335-345.

Le Bourg, B., J. Kiszka & P. Bustamante. 2014. Mother-embryo isotope (δ15N, δ13C) fractionation and mercury (Hg) transfer in aplacental deep-sea sharks. J. Fish Biol., 84: 1574-1581.

Leino, O., H. Kiviranta, A.K. Karjalainen, C. Kronberg-Kippila, H. Sinkko, E.H. Larsen, S. Virtanen & J.T. Tuomisto. 2013. Pollutant concentrations in placenta. Food Chem. Toxicol., 54: 59-69.

Lyons, K. & C.G. Lowe. 2013. Mechanisms of maternal transfer of organochlorine contaminants and mercury in the common thresher shark (*Alopias vulpinus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 70: 1667-1672.

McMeans, B.C., M.T. Arts & A.T. Fisk. 2015. Impacts of food web structure and feeding behavior on mercury exposure in Greenland sharks (*Somniosus microcephalus*). Sci. Total Environ., 509-510: 216-225. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.128.

Mieiro, C.L., M. Pacheco, M.E. Pereira & A. Costa-Duarte. 2009. Mercury distribution in key tissues of fish (*Liza aurata*) inhabiting a contaminated estuary-implications for human and ecosystem health risk assessment. J. Environ. Monit., 11: 1004-1012.

Mull, C.G., K. Lyons, M.E. Blasius, C. Winkler, J.B. O´Sullivan & C.G. Lowe. 2013. Evidence of maternal offloading of organic contaminants in white sharks (*Carcharodon carcharias*). PloS One, 8: 1-8.

Olin, J.A., M. Beaudry, A.T. Fisk & G. Paterson. 2014. Age-related polychlorinated biphenyl dynamics in immature bull sharks (*Carcharhinus leucas*). Environ. Toxicol. Chem., 33: 35-43.

Pethybridge, H., D. Cossa & E.C.V. Butler. 2010. Mercury in 16 demersal sharks from southeast Australia: biotic and abiotic sources of variation and consumer health implications. Mar. Environ. Res., 69: 18-26.

Romeo, M., Y. Siau, Z. Sidoumou & M. Gnassia-Barelli. 1999. Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. Sci. Total Environ., 232: 169-175.

Rudge, C.V., H.B. Röllin, C.M. Nogueira, Y. Thomassen, M. Rudge & J.Ø. Odland. 2009. The placenta as a barrier for toxic and essential elements in paired maternal and cord blood samples of South African delivering women. J. Environ. Monit., 11: 1322-1330.

Schmitt, C.J. & W.G. Brumbaugh. 2007. Evaluation of potentially nonlethal sampling methods for monitoring mercury concentrations in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 53: 84-95.

Soares, T.M., D.A. Coutinho, L.D. Lacerda, M.O. Moraes & M.F. Rebelo. 2011. Mercury accumulation and metallothionein expression from aquafeeds by *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 under intensive aquaculture conditions. Braz. J. Biol., 71: 131-137.

Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River, 663 pp.

Received: 30 October 2014; Accepted: 17 February 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 539-547, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-15

Research Article

Population structure of the burrowing crab *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae) in a southwestern Atlantic salt marsh

Sabrina Angeletti[1,2] & Patricia M. Cervellini[1]
[1]Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur
San Juan 670, 8000-Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina
[2]Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina
Corresponding author: Sabrina Angeletti (angelettisabrina@conicet.gov.ar)

ABSTRACT. *Neohelice granulata* inhabits estuarine and protected coastal areas in temperate regions and is the most dominant decapod crustacean in the Bahía Blanca Estuary, Argentina. The population structure was studied during a year in a SW Atlantic salt marsh located in the Bahía Blanca Estuary. Crabs were sampled monthly from August 2010 to July 2011. The maximum observed density was 30 crabs m^{-2} in February and 70 burrows m^{-2} in May. The maximum carapace width (CW) was 32 and 27.5 mm in males and females respectively. Medium size crabs were between 16 and 20 mm CW. Significantly smaller sized crabs were observed at the lower intertidal regions ($P < 0.05$). The sex ratio was favorable for males and was significantly different from the expected 1:1 ($P < 0.05$). The recruitment of unsexed juveniles crabs (CW <6.5 mm) was observed throughout the year and the presence of ovigerous females from October to February indicated seasonal reproduction. The average size of ovigerous females was CW = 20.8 mm and the smallest ovigerous female measured was 16 mm CW. For the first time, the population structure of the most important macro-invertebrate is analyzed in the Bahía Blanca Estuary. This study may help to make decisions in the area, where anthropic action is progressing day by day.

Keywords: *Neohelice granulata*, crabs, population structure, salt marsh, estuary, southwestern Atlantic.

Estructura poblacional del cangrejo cavador *Neohelice granulata* (Brachyura, Varunidae) en una marisma del Atlántico sudoccidental

RESUMEN. *Neohelice granulata* habita áreas estuarinas y costeras en regiones templadas y es el crustáceo decápodo más predominante en el estuario de Bahía Blanca, Argentina. Su estructura poblacional fue estudiada durante un año en una marisma del sudoeste Atlántico localizada en el estuario de Bahía Blanca. Los cangrejos fueron muestreados mensualmente desde agosto de 2010 hasta julio de 2011. La densidad máxima observada fue de 30 cangrejos m^{-2} en febrero y 70 cuevas m^{-2} en mayo. El ancho de caparazón (AC) máximo fue de 32 y 27,5 mm en machos y hembras, respectivamente. La longitud promedio de los cangrejos se situó entre 16 y 20 mm de AC. Cangrejos significativamente más pequeños se observaron en las regiones intermareales más bajas ($P < 0,05$). La proporción de sexos favoreció a los machos y fue significativamente diferente de la esperada 1:1 ($P < 0,05$). El reclutamiento de cangrejos juveniles asexuados (AC <6,5 mm) ocurrió todo el año y la presencia de hembras ovígeras de octubre a febrero, lo que indica una reproducción estacional. El tamaño promedio de las hembras ovígeras fue de 20,8 mm de AC y la hembra ovígeras más pequeña fue de 16 mm AC. Por primera vez se ha analizado la estructura poblacional del más importante macroinvertebrado del estuario de Bahía Blanca. Este estudio podría ayudar a tomar decisiones en el área, donde la actividad antrópica está avanzando día a día.

Keywords: *Neohelice granulata*, cangrejos, estructura poblacional, marismas, estuario, Atlántico sudoccidental.

INTRODUCTION

The salt marshes and mud flats are ecosystems which characterize the intertidal zone of estuarine and coastal areas in temperate regions. Brachyura crabs are the most abundant and ecologically important macro invertebrates inhabiting vegetated and unvegetated salt marshes areas. They are a key species in "cangrejal" eco-

Corresponding editor: Patricio Arana

systems a particular brackish salt marsh ecosystem of eastern South America (Boschi, 1964; Spivak, 2010).

Neohelice granulata (Dana, 1851) (=*Chasmagnathus granulatus*) is a semiterrestrial burrowing crab endemic from a tropical and subtropical estuaries in South America. These species occur in the southwestern Atlantic Ocean in Brazil (from Río de Janeiro 22°57'S, 52°32'W, to Rio Grande do Sul, Uruguay and San José Gulf, Northern Patagonia, Argentina 42°25'S, 64°36'W) (Spivak, 2010). Dense populations of *N. granulata* inhabit almost all zones of the intertidal, the soft bare sediments flats and areas with the cordgrass *Spartina densiflora*, *Spartina alterniflora* and *Sarcocornia perennis* (formerly known as *Salicornia ambigua*) (Botto *et al.,* 2005; Bortolus, 2006). This crab constructs vertical burrows of up to 10 cm of diameter that can reach up to 1 m depth in vegetated marshes. The burrows remain open during high tide periods and generally remain full of water during low tide. Furthermore, these burrows act as passive traps of sediment and detritus in open mud flats. Burrowing activity may also change sediment characteristics (Botto *et al.,* 2006; Mendez-Casariego *et al.*, 2011).

The structure of *N. granulata* populations (their life-history, reproduction, feeding and ecological role), have been studied in numerous locations characterized by low or fluctuating salinity, such as Dos Patos Lagoon, southern Brazil (31°04′18″S, 51°28′35″W; D'Incao *et al*., 1992; Ruffino *et al.*, 1994); Jabaquara Paraty, Brazil (23°12'26"S, 44°43'18"W; Gregati & Negreiros-Fransozo, 2007, 2009); Santa Lucía Wetlands, Uruguay (34°47'S, 56°20'W; Merentiel Ferreyra, 2014); Samborombón Bay, Buenos Aires province, Argentina (35°27'S, 56°45'W; Botto & Irigoyen, 1979; López & Rodríguez, 1998; César *et al.*, 2005); Mar Chiquita Lagoon, Buenos Aires province, Argentina (36°09'26″S, 60°34′11″W; Anger *et al.*, 1994; Spivak *et al*., 1994, 1996; Iribarne *et al*., 1997; Luppi *et al*., 1997, 2002; Bortolus & Iribarne, 1999; Iribarne, 2001; Ituarte *et al*., 2004); and San Antonio Bay, Río Negro province, Argentina, (40°44′51.43″S, 64°52′5.10″W; Bas *et al*., 2005). In Bahía Blanca, the burrowing crab activities in the estuary intertidal habitat has been extensively studied (Menone *et al.*, 2004; Botto *et al.,* 2005; Minkoff *et al.,* 2006; Alberti *et al*., 2008; Escapa *et al.,* 2008). However, available information on its population structure (abundance, composition, sex rate, size frequency) in Bahía Blanca Estuary ecosystem is null.

A structural characterization of populations is essential for the preservation of natural resources. Such data can be employed in ecological studies concerning spawning, mortality, growth and migration, for example. Thus, the main objective of this paper is to study the population structure, habitat use, seasonal variation and reproductive biology of *N. granulata* in a SW Atlantic salt marsh.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The Bahía Blanca Estuary (38°50'S, 62°30'W) is located in the southwest of Buenos Aires Province, Argentina and is characterized by a series of major NW-SE tidal channels that separate extensive tidal flats, salt marshes and islands (2.300 km^2). It is a mesotidal coastal plain estuary with a semidiurnal tidal regimen. The mean tidal amplitude ranges from 2.2 to 3.5 m and the spring tidal amplitude ranges from 3 to 4 m, with highest tidal amplitudes taking place near the head of the estuary. The estuary is characterized by low depth (between 3 and 22 m from head to mouth) and the presence of various channels and fine sand and silt-clay sediments. The main energy into the Bahía Blanca system is produced by standing and semidiurnal tides. The freshwater input to the estuary is weak, and comes mainly from two tributaries on the northern shore of the interior of the system: the Sauce Chico River and the Napostá Grande creek. The mean annual runoffs of the Sauce Chico River and Napostá Grande creek are 1.5-1.9 and 0.5-0.9 m^3 s^{-1}, respectively. The seawater salinity in the middle portion of the estuary is about 33.98 (annual mean), while the inner zone becomes hypersaline during dry summers because of the high rate of evaporation. Several ports, towns and industries are located on the northern boundaries of the estuary, discharging their processing residues into streams or directly into the estuary (Piccolo *et al.,* 2008).

The study site is located in the north coast of the Bahía Blanca Estuary; near Villa del Mar a coastal town located in the middle-outer reach of the Canal Principal where the mean tidal range is 3.5 m. A peculiar feature of this area is the total absence of tidal creeks and channels, with the exchange of tidal water and suspended sediments taking place across the entire saltmarsh front (Negrin *et al*., 2011). The substrate is composed by a mixture of 87% mud and 13% sand, showing no evidence of net sediment accumulation, rather there may be mild erosion (Pratolongo *et al.*, 2010). Salt marshes have both *Spartina* species: *S. alterniflora* that dominates the lower marsh and *S. densiflora* along with *Sarcocornia perennis* dominating the upper marsh area. The very extensive intertidal is dominated by the burrowing crab *N. granulata* (Bortolus, 2006; Isacch *et al.,* 2006) (Fig. 1).

Field measurements

Sampling was conducted monthly in the intertidal zone, between August 2010 and July 2011. Four micro-habitats subject to different hydrodynamic and ecological

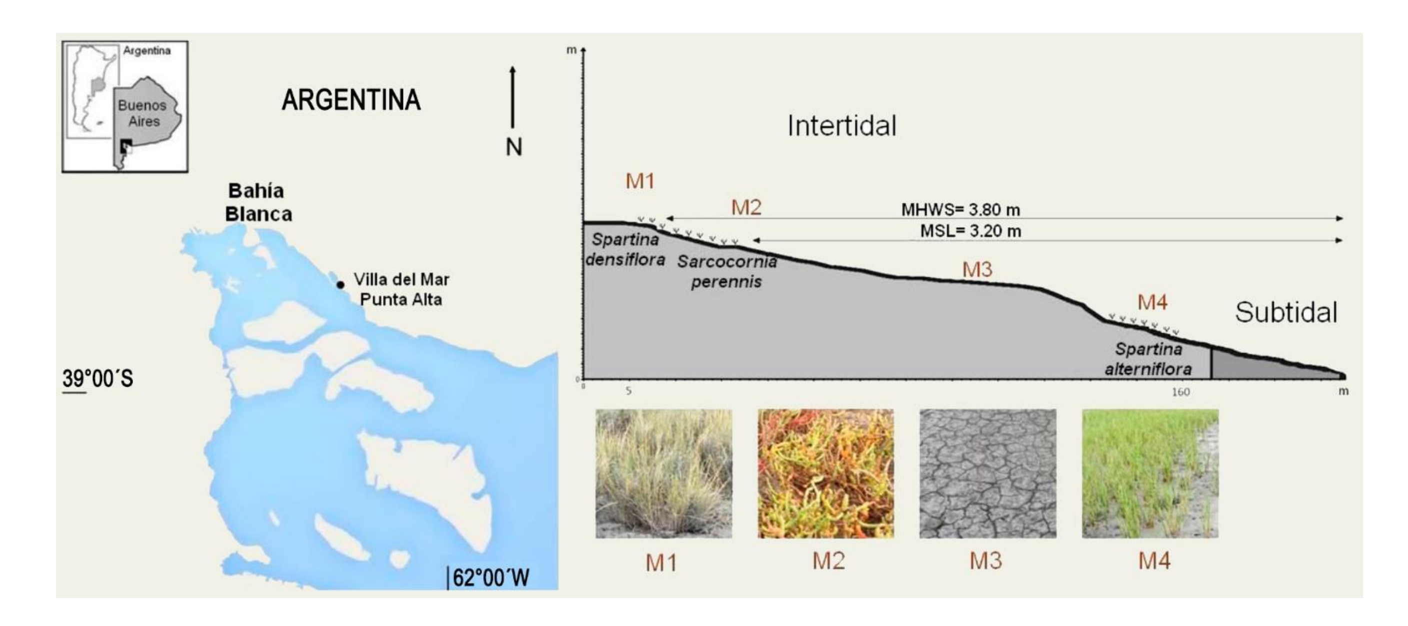


Figure 1. Study area with sampling sites (M1, M2, M3 and M4).

conditions were preselected: two vegetated saltmarshes in the upper intertidal; one dominated by *S. densiflora* (M1) and the other dominated by *S. perennis* (M2), a middle non-vegetated open mudflat (M3) and a low vegetated saltmarshes dominated by *S. alterniflora* (M4). Burrows and crabs densities were calculated using quadrats (0.5x0.5 m side) which were randomly allocated in each microhabitats during low tides, when the area was exposed (n = 4 samples in each site), counting burrows and collecting all crabs present inside the squares. Crabs were kept in 4% formaldehyde for morphometric analysis and transported to the laboratory.

Laboratory measurements and data analysis

Once in the laboratory, crabs were counted and classified as male, female or undifferentiated (those which did not present secondary sexual characters). Ovigerous females were registered. The following somatic parts of each crab were measured: maximum carapace width (CW; was always measured behind the third cephalothoracic spine), abdomen width for females (AW; obtained from the 5th to 6th abdominal somite) and gonopod length for males (GL) to the nearest 0.1 mm using a Vernier caliper. Only crabs in intermoult stages and complete, without any defective appendages, were used in this analysis.

Densities were compared among sites and dates by a two-way ANOVA with equal proportional replication (Zar, 1996), applied to detect differences between mean densities of all crabs and their burrows. Data were also checked for homoscedasticity. Crabs collected in all quadrats of each site were pooled and a size frequency distribution was constructed for each microhabitat and for the whole intertidal zone; size intervals used for grouping individuals were 4 mm. Size differences were compared by means of Kruskal-Wallis test. Spatial variations in sex ratio were tested using X^2 tests. We compared some life history traits between Bahía Blanca Estuary and other *N. granulata*'s populations in South America.

RESULTS

The 434 *N. granulata* crabs captured included 259 males, 142 females and 33 undifferentiated. All of them were found inside and around the burrows. Crabs, lived both in vegetated and un-vegetated areas and were mostly distributed in the upper and lower tide level, but density varied between zones and between different sampling dates. Maximum density of the year was 30 crabs m^{-2} in February, in M4. *N. granulata* was found at M1, M2 and M4 during all seasons but never in M3. M1 shows more number of crabs in spring (September and November), while M2 shows more crabs in summer and autumn (January and February, May and June respectively) and M4 in summer (December and February) (Fig. 2). Density of crabs showed no significant variations among months ($F_{2.25} = 1.39$; $P > 0.24$) neither among sampling sites ($F_{3.44} = 2.13$; $P > 0.14$).

A total of 893 burrows were registered, the maximum observed density was 70 burrows m^{-2} in May, in M2. Few burrows were recorded in M3 in autumn, but they were absent the rest of the year (Fig. 3).

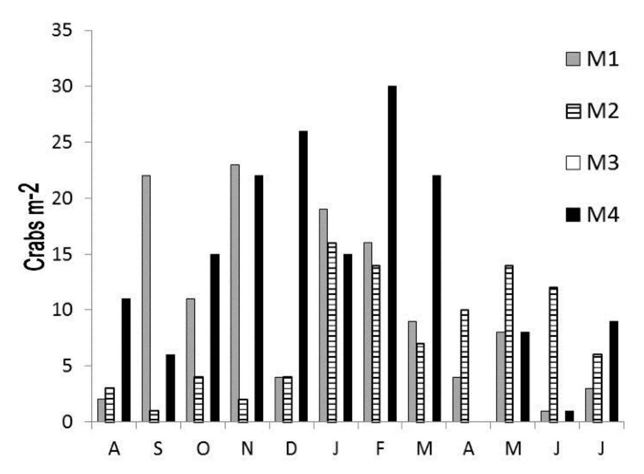


Figure 2. Population density (crabs m^{-2}) of *N. granulata* monthly at different sampling sites.

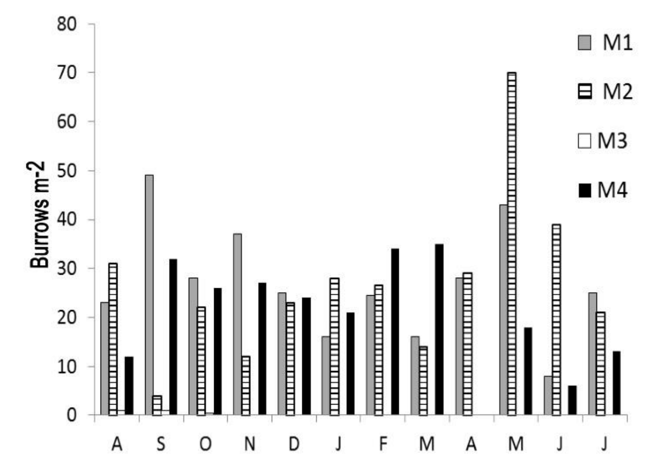


Figure 3. Burrows density (burrows m^{-2}) of *N. granulata* monthly at different sampling sites.

The density of the crab's burrows showed no significant variations among months ($F_{2.26}$ = 0.72; P > 0.70) nor among sampling sites ($F_{3.44}$ = 0.76; P > 0.48). Burrows' densities show similar variations with crab's densities: M1 shows more number of burrows in spring (September), M2 in autumn (May) and M4 in summer (February). While the absence in M4 of burrows and crabs, in April, may be due to the estuary's high dynamic for that period, where the sample area was not defined.

N. granulata was recorded in all class intervals for the distribution of sizes. The crab population in the whole intertidal zone (all sites polled) through the year showed a unimodal size-frequency-distribution (one size group was identified) and skewed to the right. Medium size crabs were mostly predominating (between 16-20 mm CW). Maximum CW was 32 mm and 3.5 mm minimum. In smaller than 6.5 mm crabs no external morphological differences between sexes were observed and were considered sexually undifferentiated. The maximum and minimum size reached was 32 and 6.5 mm respectively for males, and 27.5 and 7.5 mm for females (Fig. 4).

When we analyzed the size-frequency-distribution (SFD) of each microhabitat, the histograms showed differences between them. In M1, medium size crabs registered in this study were predominating too, but it was characterized by two main modes or size groups; the mayor frequencies were between 8-12 mm and between 16-20 mm CW. M2 showed the presence of only one mode which was approximately 16-20 mm CW. Moreover in M4 small size crabs were predominating; between 4-8 mm CW (Fig. 5). The SFD varied significantly among sites (Kruskal-Wallis test); the assumption of equality among samples was not met (H = 15.6337; P < 0.05).

For population biology analysis, the crabs were distributed in two categories: unsexed crabs (undifferentiated) and sexed crabs (juveniles and adults). The smaller crabs (undifferentiated) were more abundant in M4 than in M1 and M2. There were more males than females in the whole intertidal area studied. The sex ratio varied in space (among sites) and differed significantly from 1:1 (Fig. 6). The Chi-square tests for difference in male and female sex ratios showed significant differences along the coast of Bahía Blanca estuary. In M1 ratio = 1.8:1, in M2 ratio = 2:1 and in M4 ratio = 1.7:1 (P < 0.05).

Ovigerous females (n = 11) were only found at M4 during spring and summer (from October to February), practically disappeared at the beginning of autumn, and apparently remained absent during winter. The average size of ovigerous females was CW = 20.8 mm and AW = 12.1 mm. The biggest ovigerous female measured was 23.5 mm CW and 14.5 mm AW (in January) and the smallest ovigerous female measured was 16 mm CW and 10 mm AW (in February). In M4, the proportion of ovigerous females was 50% (October, n = 5) and 5% (February, n = 1). Females from M1 and M2 were always non-ovigerous.

DISCUSSION

The Bahía Blanca Estuary is a temperate zone with well distinct thermal seasons; mean temperatures vary from 14°C in winter to 20°C in summer, this means that summers and winters are rigorous, and the intermediate seasons are more benign. The annual mean rainfall is 630 mm, with maximum values in March and October (90.9 and 80.9 mm respectively) and lowest values in winter (June; 16.5 mm). Salinity ranges from 15.84 in winter to 40.91 in summer with an annual mean of 33.98.

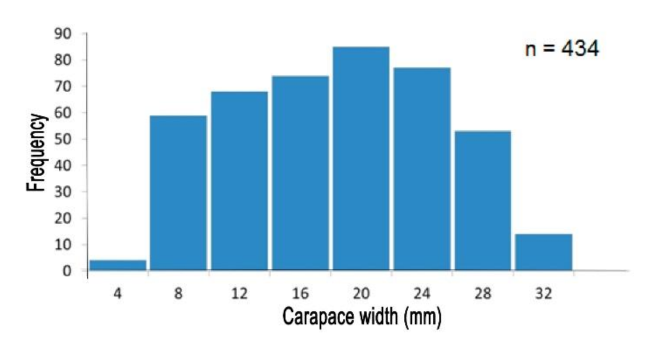


Figure 4. Size-frequency distribution of *N. granulata* (n = 434) in the whole intertidal zone through the year.

Due to the system high dynamics, dissolved oxygen is always near saturation levels and the pH is near neutrality (Piccolo & Hoffmeyer, 2004). The predominant sediments vary from mud to sands (Angeletti *et al*., 2014). Based on this previous information, these crabs would have a wide range of tolerance to the environmental factors cited for this estuary.

The density of *N. granulata* in Bahía Blanca estuary is the lowest compared with other populations. However, *N. granulata* density does not decrease along with increasing latitude, and the abundant center hypothesis along a wide latitudinal range cannot be applied (Sagarin & Gaines, 2002). Values registered in San Antonio Bay, near the southern limit of its geographical distribution (136 ind m^{-2}, Bas *et al*., 2005), were higher than the maximum reported for Mar Chiquita Lagoon (53 ind m^{-2}, Spivak *et al.*, 1994) and for Samborombón Bay (52 ind m^{-2}, César *et al*., 2005). Intermediate values were found in the northernmost populations studied (98 ind m^{-2}, Dos Patos Lagoon; D'Incao *et al*., 1992).

Although there is scarce previous information about the number of burrows, our data indicates that the maximum burrow's density is less compared with the observed in Santa Lucia Wetlands, Uruguay (95 burrows m^{-2}; Merentiel-Ferreyra, 2014). Both populations have the maximum number of burrows in May. This curious feature is not related to the maximum density of crabs neither with environmental factors, such as temperature. So, further samplings are needed to analyze this phenomenon.

N. granulata is a semi-terrestrial species, active from spring throughout most autumn, but remains inactive or hidden inside their burrows during winter. Consequently, the time available for feeding and growth should be limited by cold periods (Bas *et al*., 2005). So, the fact that M1 and M2 showed more number of crabs in spring and autumn respectively, would respond to the crab's needs to feed with halophy-

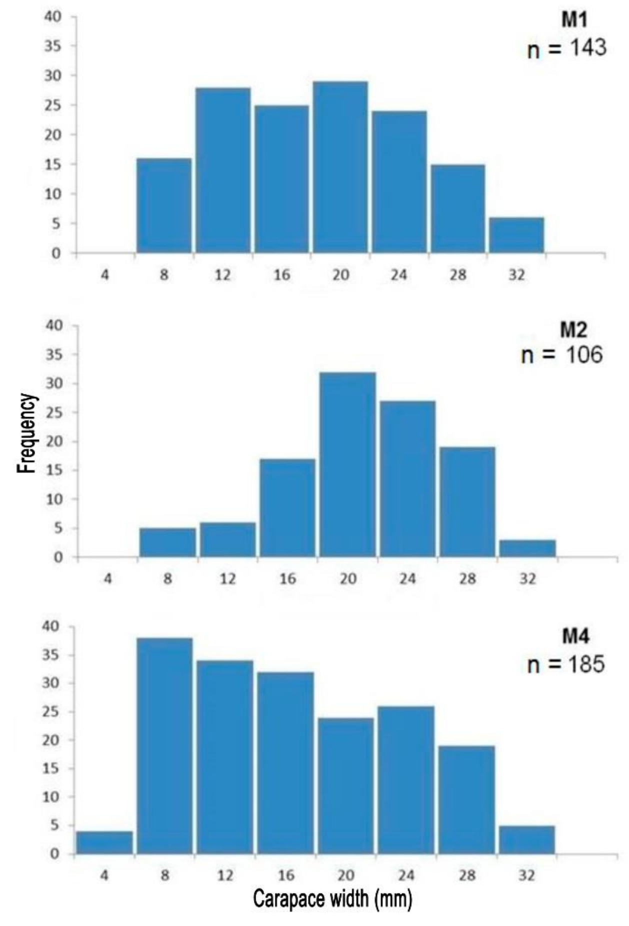


Figure 5. Size-frequency distribution of *N. granulata* at different sampling sites.

tes species *S. densiflora* and *S. perennis*, and in this way to face and recover (before and after) the cold season. They would take advantage of the shelter and food provided by these plants present in the intertidal highest areas. On the other hand, M4 presented more crabs in summer and this correspond to a mainly fact for mating and larvae eclosion, because the proximity to the water allows the successful development of these. According to Mantelatto & Biagi-García (1999) this move would be associated with reproductive strategies. Movements among microhabitats through the year could be a kind of migration in the intertidal, responding to the crabs needs. On the other hand, it is known that the colonization of intertidal by *N. granulata* is facilitated by the presence of halophyte plants that generate shaded areas where the sediment stays moist, soft and more likely to be excavated (Bortolus *et al.*, 2002). Therefore, we assumed that the almost total absence of burrows and crabs in M3 could be due to both cohesive nature of sediment and the lack of plants (Angeletti *et al*., 2014).

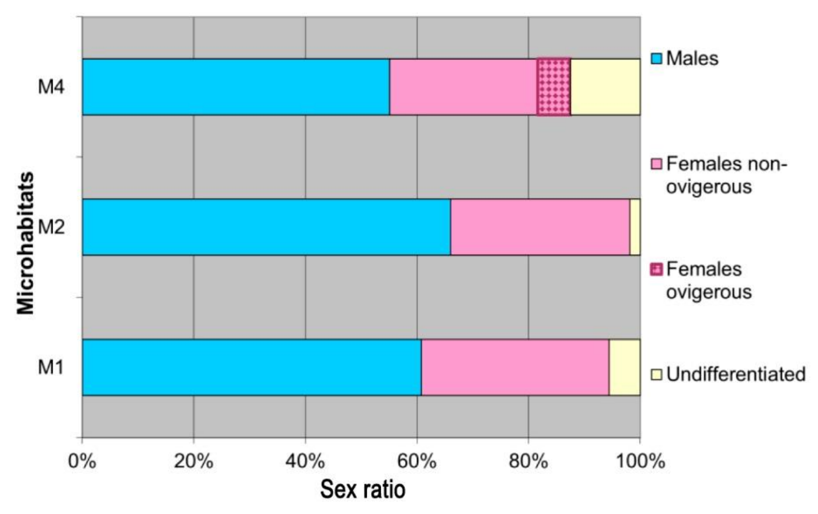


Figure 6. Sex ratio (in % of total population) of *N. granulata* at different sampling sites.

The maximum size of males and females of *N. granulata* in Bahía Blanca Estuary (32 and 27.5 mm CW, respectively) was smaller than in Mar Chiquita (39.5 and 35 mm CW; Spivak *et al.*, 1996) and Jabaquara Paraty, RJ, Brasil (39.5 and 36.8 mm CW; Gregati & Negreiros-Fransozo, 2007). However, quite similar to San Antonio Bay (32 and 29.8 mm CW; Bas *et al.*, 2005); Samborombón Bay (33.2 mm CW for males; César *et al.*, 2005); and Santa Lucía Wetlands (32.9 and 29.8 mm CW; Merentiel Ferreyra, 2014). Size variations are common likely due to the phenotypic plasticity of the organisms, a consequence of a reduced growth per molt or influenced by environmental factors (as photoperiod, temperature and rainfall) that also affect the food availability (Gregati & Negreiros-Fransozo, 2007). Such environmental factors can explain the larger size of *N. granulate* specimens from Mar Chiquita and Jabaquara Paraty RJ, when compared with these populations of Bahía Blanca. The availability and the quality of the food, besides an adequate substratum in the environment are the main factors that influence the growth and size of the crabs (Colpo & Negreiros-Fransozo, 2002).

The fact that males are larger than females, this differential growth between sexes can be explained by processes related to reproductive events. When females reach maturity, they grow more slowly because of energy allocation to egg production. As in this study, it is very common to find males reaching larger sizes than females (Gregati & Negreiros-Fransozo, 2007). Even though the variation in maximum size, the minimum size of ovigerous females observed in Bahía Blanca estuary (16 mm CW) is similar to that reported for Dos Patos Lagoon (16.5 mm CW; Ruffino *et al*., 1994), San Antonio Bay (17 mm CW; Bas *et al.*, 2005); Jabaquara Paraty (17.5 mm CW; Gregati & Negreiros-Fransozo, 2009), so a modification in maturity size is not evident.

A unimodal and asymmetrical frequency-distribution pattern is very common among Decapoda species from tropical regions without abrupt climatic variations, which suggests that the population is in equilibrium, with continuous recruitment and constant mortality rate (Hartnoll & Bryant, 1990). Moreover, the spatial and temporal variations in size frequency distributions among microhabitats suggest that the structure of this population is dynamic (due to migration, growth and recruitment) and that there is a clear spatial segregation of sizes. The ovigerous females were recorded between October to February, which confirmed that *N. granulata* spawning in Bahía Blanca Estuary occurs in almost spring and summer (Cervellini, 2001). This coincides with months of higher environmental temperature. The reproductive period, in Mar Chiquita Lagoon and San Antonio Bay, was recorded from November to February (Spivak *et al*., 1994; Bas *et al.*, 2005); in Santa Lucia Wetlands from October to March (Merentiel-Ferreyra, 2014) and in Samborombón only in the summer months (César *et al.,* 2005). In the tropical mangrove population of Brazil the females had continuous reproductive periods and were found throughout the year (Gregati & Negreiros-Fransozo, 2009). While to determine the reproductive period of a species, the percentage of ovigerous females over the year is the most common technique used, the gonadal activity should be consider for a better estimation. It is important to say that in Elías *et al.* (2011), embryos were found inside females in the state prior to maturity. This critical topic needs more research.

The population structure of the most important macro-invertebrate in a region of such importance as Bahia Blanca Estuary has been analyzed for the first time. The comparative analysis of the population structure of *N. granulata* with other populations of South America reveals that latitudinal range is not a valid response for the considerable variations between them. Despite *N. granulata* has been investigated by many research group, studies of local physical and biological conditions (type of substratum, salinity, competition, predation) are needed to understand the variations and environmental influences concerning the latitudinal and environmental aspects of this population in the Bahía Blanca Estuary. We are working on this area and we hope to solve these questions.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to Perla H. Angeletti and Dr. Jorge O. Pierini for their advice and helpful comments in the manuscript. This work was supported by a training scholarship from CIC (Comisión de Investigaciones Científicas, Argentina).

REFERENCES

Alberti, J., M. Escapa, O.O. Iribarne, B. Silliman & M. Bertness. 2008. Crab herbivory regulates plant facilitative and competitive processes in Argentinean marshes. Ecology, 89: 155-164.

Angeletti, S., L. Lescano & P.M. Cervellini. 2014. Caracterización biosedimentológica y mineralógica de dos sectores intermareales del estuario de Bahía Blanca. Geoacta, 39(2): 54-67.

Anger, K., C. Bas, E. Spivak, D. Ismael & T. Luppi. 1994. Hatching rhythms and dispersion of decapod crustacean larvae in a brackish coastal lagoon in Argentina. Helgolander Meeresun., 48: 445-466.

Bas, C., T. Luppi & E. Spivak. 2005. Population structure of the South American estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura: Varunidae) near the southern limit of its geographical distribution: comparison with northern populations. Hydrobiologia, 537: 217-228.

Bortolus, A. 2006. The austral cordgrass *Spartina densiflora* Brong: its taxonomy, biogeography, and natural history. J. Biogeogr., 33: 158-168.

Bortolus A. & O. Iribarne. 1999. Effects of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. Mar. Ecol. Prog. Ser., 178: 79-88.

Bortolus, A., E. Schwindt & O. Iribarne, 2002. Positive plant-animal interactions of an Argentinean coastal lagoon. Ecology, 83: 733-742.

Boschi, E.E. 1964. Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). Bol. Inst. Biol. Mar., Mar del Plata, 6: 1-99.

Botto, J.L. & H.R. Irigoyen. 1979. Bioecología de la comunidad del cangrejal. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulatus* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, Provincia de Buenos Aires. Seminario Latinoamericano de Ecología Bentónica y Sedimentología de la Plataforma Continental del Atlántico Sur. UNESCO, Montevideo, pp. 161-169.

Botto, F., O. Iribarne, J. Gutierrez, J. Bava & A. Gagliardini. 2006. The ecological importance of passive deposition of meiofauna and organic matter into burrows of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 312: 201-210.

Botto, F., I. Valiela, O. Iribarne, P. Martinetto & J. Alberti. 2005. Effect of burrowing crabs in isotope signatures of sediment, primary producers, and the food web in SW Atlantic salt marshes. Mar. Ecol. Prog. Ser., 293: 155-164.

Cervellini, P.M. 2001. Variabilidad en la abundancia y retención de larvas de crustáceos decápodos en el estuario de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Invest. Mar., Valparaíso, 29(2): 25-33.

César, I.I., L.C. Armendáriz & R.V. Becerra. 2005. Biocecology of the fiddler crab *Uca uruguayensis* and the burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura) in the Refugio de Vida Silvestre Bahía Samborombón, Argentina. Hydrobiologia, 545: 237-248.

Colpo, K.D. & M.L. Negreiros-Frasozo. 2002. Reproductive output of *Uca vocator* (Herbst, 1804) (Brachyura, Ocypodidae) from three subtropical mangroves in Brazil. Crustaceana, 76: 1-11.

D'Incao, F., M.L. Ruffino, K.G. da Silva & A. da Costa Braga. 1992. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda: Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 161: 179-188.

Elías, F.G., P.M. Cervellini & S. Angeletti. 2011. Estadios gametogénicos e inicio de embriogénesis en hembras de *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura) con técnicas microscópicas. Abstract. XIV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar-COLACMAR. Camboriú, Santa Catarina, pp. 2-5.

Escapa, M., G.M.E. Perillo & O. Iribarne. 2008. Sediment dynamics modulated by burrowing crab activities in contrasting SW Atlantic intertidal habitats. Estuar. Coast. Shelf S., 80: 365-373.

Gregati, R.A. & M.L. Negreiros-Fransozo. 2007. Relative growth and morphological sexual maturity of *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Varunidae) from a mangrove area in southeastern Brazilian coast. Iheringia, Ser. Zool., 97: 268-272.

Gregati, R.A. & M.L. Negreiros-Fransozo. 2009. Population biology of a burrowing crab *Neohelice granulata,* (Crustacea: Decapoda: Varunidae) from a tropical mangrove in Brazil. Zool. Curitiba, 26(1): 32-37.

Hartnoll, R.G. & A.D. Bryant. 1990. Size-frequency distributions in Decapod Crustacea - the quick, the dead, and the cast-offs. J. Crustacean Biol., 10: 14-19.

Iribarne, O. 2001. Reserva de biosfera Mar Chiquita: características físicas, biológicas y ecológicas. Editorial Martin, Mar del Plata, 320 pp.

Iribarne, O., A. Bortolus & F. Botto. 1997. Between, habitats differences in burrow characteristics and trophic modes in the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 155: 132-145.

Isacch, J.P., C.S.B. Costa, L. Rodríguez-Gallego, D. Conde, M. Escapa, D.A. Gagliardini & O.O. Iribarne. 2006. Association between distribution pattern of plant communities and environmental factors in SW Atlantic saltmarshes. J. Biogeogr., 33: 888-902.

Ituarte, R.B., E.D. Spivak & T.A. Luppi. 2004. Female reproductive cycle of the southwestern Atlantic estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Grapsoidea, Varunidae). Sci. Mar., 68: 127-137.

López, L. & E. Rodríguez. 1998. Somatic growth in juveniles of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) (Brachyura, Grapsidae), under laboratory conditions. Invest. Mar., Valparaíso, 26: 127-135.

Luppi, T.A., C. Bas, E. Spivak & K. Anger. 1997. Fecundity of two grapsid crab species in the Laguna Mar Chiquita, Argentina. Arch. Fish. Mar. Res., 45: 149-166.

Luppi, T.A., E. Spivak, K. Anger & J.L. Valero. 2002. Patterns and processes of *Chasmagnathus granulatus* and *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: Grapsidae) recruitment in Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. Estuar. Coast. Shelf S., 55: 287-297.

Mantelatto, F.L.M. & R. Biagi-García. 1999. Reproductive potential of the hermit crab *Calcinus tibicen* (Anomura) from Ubatuba, Sao Paulo, Brazil. J. Crustacean Biol., 19(2): 266-275.

Mendez-Casariego, A., T. Luppi, O. Iribarne & P. Daleo. 2011. Increase of organic matter transport between marshes and tidal flats by the burrowing crab *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* Dana in SW Atlantic salt marshes. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 401: 110-117.

Menone, M., K.S.B. Miglioranza, O. Iribarne, J.E.A. Aizpún de Moreno & V.J. Moreno. 2004. The role of burrowing beds and burrows of the SW Atlantic intertidal crab *Chasmagnathus granulata* in trapping organochlorine pesticides. Mar. Pollut. Bull., 48: 240-247.

Merentiel-Ferreyra, M.N. 2014. Biología poblacional del cangrejo estuarino *Neohelice granulata* (Dana, 1851) (Crustacea: Brachyura: Varunidae) en los humedales del Santa Lucía, Montevideo. Tesis de Maestría en Biología, Opción Zoología. Universidad de la República, Montevideo, 62 pp.

Minkoff, D.R., M. Escapa, F.E. Ferramola, S.D. Maraschin, J.O. Pierini, G.M.E. Perillo & C. Delrieux. 2006. Effects of crab-halophytic plant interactions of creek growth in a S.W. Atlanthinc salt marsh: a cellular automata model. Estuar. Coast. Shelf Sci., 69: 403-413.

Negrin, V.L., C.V. Spetter, R.O. Asteasuain, G.M.E. Perillo & J.E. Marcovecchio. 2011. Influence of flooding and vegetation on carbon, nitrogen, and phosphorus dynamics in the pore water of a *Spartina alterniflora* salt marsh. J. Environ. Sci., 23(2): 212-221.

Piccolo, M.C. & M.S. Hoffmeyer. 2004. Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, 233 pp.

Piccolo, M.C., G.M.E. Perillo & W.D. Melo. 2008. The Bahía Blanca Estuary: an integrated overview of its geomorphology and dynamics. In: R. Neves, J. Baretta & M. Mateus (eds.). Perspectives on integrated coastal zone management in South America. IST Press, Lisboa, pp. 219-229.

Pratolongo, P.D., G.ME. Perillo & M.C. Piccolo. 2010. Combined effects of waves and plants on a mud deposition event at a mudflat-saltmarsh edge in the Bahía Blanca Estuary. Estuar. Coast. Shelf S., 87: 207-212.

Ruffino, M.L., M.D. Telles & F.D'Incao. 1994. Reproductive aspects of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae) in the Patos Lagoon Estuary, Brazil. Nauplius, 2: 43-52.

Sagarin, R.D. & S.D. Gaines. 2002. Geographical abundance distributions of coastal invertebrates: using one-dimensional ranges to test biogeographic hypotheses. J. Biogeogr., 29: 985-997.

Spivak, E.D. 2010. The crab *Neohelice* (=*Chasmag-nathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. Helgoland Mar. Res., 64: 149-154.

Spivak, E., K. Anger, T. Luppi, C. Bas & D. Ismael. 1994. Distribution and habitat preferentes of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of

Buenos Aires, Argentina). Helgolander Meeresun, 48: 59-78.

Spivak, E.D., K. Anger, T.A. Luppi, C. Bas & D. Ismael. 1996. Size structure, sex ratio, and breeding season in two intertidal grapsid crabs species from Mar Chiquita Lagoon, Argentina. Neritica, 10: 7-26.

Received: 12 February 2014; Accepted: 13 March 2015

Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 662 pp.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 548-556, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-16

Research Article

Efectividad del monitoreo de la anidación de tortugas marinas para determinar el éxito reproductivo en playas del sur de Cuba

Julia Azanza-Ricardo[1], José Luis Gerhartz-Muro[2]
Yanet Forneiro Martín-Viaña[3] & Félix Moncada-Gavilán[4]
[1]Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana, MES. WIDECAST
Coordinador en Cuba, 16 Nº114, CP 11300, Playa, Ciudad Habana, Cuba
[2]Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), 16 Nº114, CP 11300, Playa, Ciudad Habana, Cuba
[3]Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna, Ministerio de Agricultura (MINAG)
Edificio Minag, Carlos M. Céspedes, Nuevo Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba
[4]Centro de Investigaciones Pesqueras. MINAL, WIDECAST Coordinador en Cuba
Calle 246 Nº503 Barlovento, Santa Fé, Playa, La Habana, Cuba, CP 19.100
Corresponding author: Julia Azanza-Ricardo (jaricardo@instec.cu)

RESUMEN. El monitoreo de las anidaciones es muy útil como herramienta para la conservación pero el esfuerzo de trabajo en diferentes áreas puede variar grandemente. En Cuba, se aplican cuatro enfoques diferentes: monitoreo sistemático nocturno y diurno (MSN), y monitoreo esporádico con o sin comprobación de nidos (MECC). La cantidad y exactitud de los datos tomados y la calidad de la información derivada de ellos difieren. Por esta razón, en el presente trabajo se evalúa la efectividad de cada enfoque para determinar el éxito reproductivo de tortugas marinas en Cuba. El MSN sólo se realiza en las playas de anidación de la Península de Guanahacabibes, mientras que el MECC es el más extendido en el país. La porción de la temporada de anidación de cada una de las tres especies que anidan en Cuba (*Chelonia mydas*, *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata*) que se cubre con personal de monitoreo es baja para la mayoría de las playas, y sobre todo en el caso de *E. imbricata*. Se detectaron diferencias entre el monitoreo sistemático y esporádico, por tanto, la capacidad de detectar rastros falsos y verdaderos depende esencialmente de la frecuencia de monitoreo. Esto afecta la capacidad para evaluar el éxito de la anidación por playas. A pesar del incremento en los esfuerzos realizados en Cuba para el seguimiento de las principales colonias de anidación, se deben identificar nuevas estrategias para garantizar la correcta toma de información, y una mayor eficiencia del programa de monitoreo para obtener la mayor información posible de cada una de las especies con un adecuado balance de costo-beneficio.

Palabras clave: tortugas marinas, anidación, esfuerzo de monitoreo, conservación, Cuba.

Effectiveness of monitoring techniques employed to determine reproductive success of marine turtles in Cuba

ABSTRACT. Monitoring of nesting has been used globally to estimate the population size of marine turtles. Nevertheless, monitoring effort varies widely, for instance in Cuba, four different approaches are applied: nighttime systematic monitoring, daytime systematic monitoring, sporadic monitoring with nest verification, and sporadic monitoring with no verification. These variations imply that the amount and accuracy of data gathered and the quality of derived information, differ amongst the approaches. This paper assesses the effectiveness of the different methodologies used for determining the reproduction success of marine turtles in Cuba. Nighttime systematic monitoring is only carried out in one area, while sporadic monitoring with nest verification is the most used approach along the country. The proportion of the nesting season covered with monitoring personnel is low in most of the beaches and for all the three species (*Chelonia mydas, Caretta caretta* and *Eretmochelys imbricata*), although the species in the most critical situation is hawksbill. Significant differences were found between systematic and sporadic monitoring, which has important implications for the understanding of the nesting behavior, as the capacity to detect false and true crawls essentially depends on

Corresponding editor: Sergio Palma

the monitoring frequency, according to our findings. Low detection capacity in sporadic monitoring hampered the development of efficiency assessments in all the nesting beaches. In summary, despite the effort carried out nationwide to monitor nesting populations that has even increased in the last three years, important gaps exists and new monitoring strategies are needed to guarantee the right information for the species is gathered, while adequate cost-benefit balance is achieved.

Keywords: marine turtles, nesting, monitoring effort, conservation, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Históricamente, el monitoreo de las anidaciones ha sido la herramienta de mayor uso a nivel mundial entre los especialistas en tortugas marinas como estimador de los tamaños poblacionales. Los resultados obtenidos en estos estudios permiten la evaluación y seguimiento de la condición de las poblaciones de tortugas marinas. Estas valoraciones son necesarias para conocer los efectos de las acciones de conservación y manejo implementadas en todas las fases de la historia de vida de estas especies (Schroeder & Murphy, 2000). Para la caracterización integral de una población anidadora se requieren estudios de diferentes aspectos de la biología tales como la dinámica poblacional, especialmente las migraciones (Balazs, 1999; Block *et al*., 2003) y composición etaria (Frazer & Ehrhart, 1985; Cheng, 2002; Broderick *et al*., 2003), éxito reproductivo (Antworth *et al*., 2006), y efecto de los factores abióticos (Hawkes *et al.*, 2007). No obstante, el esfuerzo de trabajo puede variar enormemente y se puede encontrar evaluaciones puntuales o monitoreos sistemáticos durante toda la temporada de anidación. También la capacidad de las personas que realizan los estudios es muy variable lo que repercute en la calidad de la información obtenida. Estos factores inciden a la larga en la capacidad para realizar estimaciones válidas sobre la condición de las poblaciones anidadoras (Schroeder & Murphy, 2000). Además del factor humano, las características de la especie estudiada, densidad de la anidación, tipo de playa, condiciones en que se realiza el censo, especialmente en cuanto a la hora en que se realiza, las condiciones meteorológicas y de iluminación, y la actividad humana en la playa afectan la capacidad para realizar estimaciones válidas sobre la condición de las poblaciones anidadoras. En Cuba, de las tres especies que anidan: la tortuga verde (*Chelonia mydas*), la caguama (*Caretta caretta*) y el carey (*Eretmochelys imbricata*), las dos últimas tienen nidos difíciles de reconocer y se pierden con facilidad.

La frecuencia de monitoreo en las playas de anidación también es variable. Está sujeta a diversos factores como las características geográficas del área de estudio (principalmente el aislamiento), personal y equipamiento disponibles y densidad de los nidos.

En Cuba el monitoreo de la anidación está orientado a la realización de censos totales de nidos, sin considerar un diseño de muestreo estadístico. Para su realización se aplican cuatro enfoques: monitoreo sistemático nocturno (MSN), monitoreo sistemático diurno (MSD), monitoreo esporádico con comprobación de nidos (MECC) y monitoreo esporádico sin comprobación de nidos (MESC). Cada enfoque implica un esfuerzo en el monitoreo diferente y por tanto, la información aportada y su precisión varían de un método a otro. En el presente trabajo se pretende evaluar la efectividad del monitoreo que se realiza para determinar el éxito reproductivo de tortugas marinas en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

En aguas cubanas, el monitoreo de las tortugas marinas abarca las principales áreas de anidación de la plataforma sur del archipiélago cubano con excepción de la región suroriental y algunas playas de los archipiélagos del norte (Fig. 1). Dentro de cada área se seleccionaron playas consideradas como índices o prioritarias para el monitoreo. Su selección fue determinada fundamentalmente por su importancia para la anidación de una o varias de las especies que anidan en Cuba, aunque en segundo término influyó su accesibilidad para garantizar la continuidad del monitoreo. El resto de las playas se consideraron secundarias y por tanto, con menor prioridad para el monitoreo.

El análisis se realizó solamente en el periodo 2010-2013 para utilizar los datos obtenidos en el monitoreo según el protocolo establecido en el marco del Programa Nacional de Tortugas Marinas a partir de 2010, aunque dicho protocolo fue publicado con posterioridad (Moncada-Gavilán *et al.*, 2013). Para la caracterización, se analizó la cantidad de playas monitoreadas (Fig. 1) por año y el porcentaje de cada tipo de monitoreo empleado.

El monitoreo sistemático nocturno (MSN), implica el trabajo durante toda la noche para el seguimiento de todo el proceso de anidación de las hembras que anidan, todos los días, al menos durante el máximo reproductivo. En el monitoreo sistemático diurno (MSD) se realizan

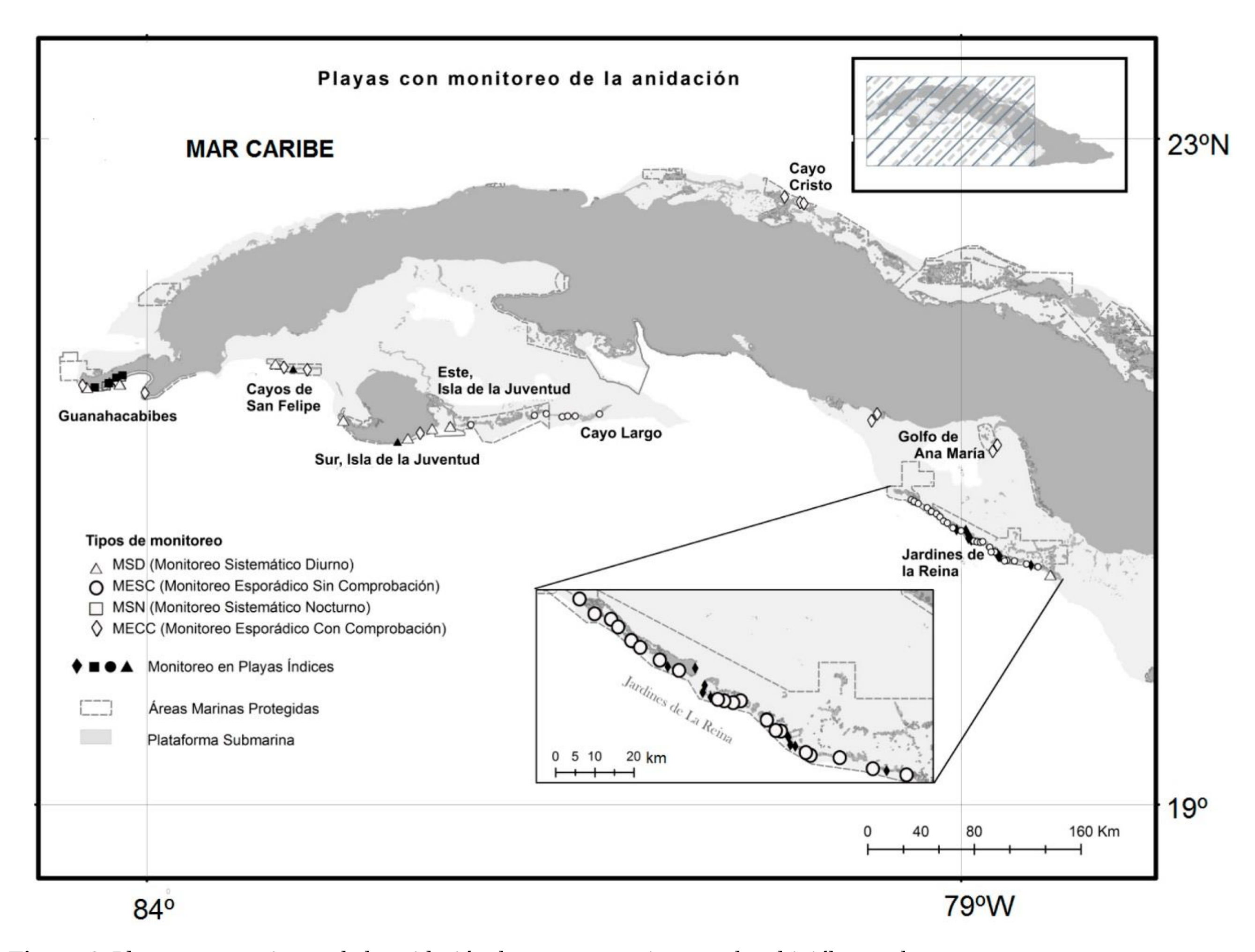


Figura 1. Playas con monitoreo de la anidación de tortugas marinas en el archipiélago cubano.

recorridos al menos cada tres días para contabilizar las anidaciones ocurridas y se verifica la presencia de huevos en los nidos encontrados. Se denominó monitoreo esporádico con comprobación de nidos (MECC) al realizado esporádicamente en horario diurno durante la temporada, con una frecuencia quincenal o menor, pero verificando los nidos encontrados. Finalmente, el monitoreo esporádico donde no se verifica la presencia de huevos en los nidos que se contabilizan, denominado monitoreo esporádico sin comprobación de nidos (MESC).

La efectividad de cada tipo de monitoreo en la determinación del éxito reproductivo se evaluó a partir de tres aspectos: la capacidad de aproximarse a un censo total de nidos de cada especie, la capacidad de detección de los fallos en la anidación con relación al total de nidos y la capacidad para determinar correctamente el número de huevos por nido.

Se determinó para las tres especies que anidan de manera sistemática en el archipiélago cubano (*C. mydas*, *C. caretta* y *E. imbricata*) y por grupos de playas, el porcentaje de la temporada reproductiva cubierto por el monitoreo, como medida indirecta de cuán cercano está el monitoreo a un censo total. La temporada reproductiva de *C. caretta* es de mayo a agosto, *C. mydas* de junio a septiembre y *E. imbricata* de octubre a febrero. Para ello se consideró el número de días que dura la temporada reproductiva de cada especie, se dividió por tres según el criterio de que un monitoreo cada tres días es adecuado a partir de los estándares establecidos por SWOT (2011) y este valor total fue utilizado como valor óptimo por el cual se dividió el número de días en los que realmente se realizó monitoreo. Este valor multiplicado por 100 constituye el porcentaje de la temporada reproductiva cubierto con monitoreo. Para complementar este análisis, se clasificaron los grupos de playas aplicando los estándares SWOT (2011) en dos categorías: Nivel 1 (L1), que incluye las playas que cumplen con los estándares mínimos necesarios para ser considerados en la base de datos SWOT porque se realizan conteos de la abundancia total o estimados con error de

muestreo menor o igual al 20% y Nivel 2 (L2), las que no cumplen con los estándares SWOT porque los estimados de abundancia tienen un error de muestreo superior al 20%.

Posteriormente, se determinó la relación nidos/ rastros detectados en cada tipo de monitoreo y se analizó si existían diferencias significativas entre ellos, bajo el supuesto que la relación disminuye a medida que se detecta mejor los rastros falsos, lo que supone una mejor detección de los fallos en la anidación. Para el análisis estadístico, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Sokal & Rohlf, 1995), se comprobó si la relación nidos/rastros cumplía con la condición de normalidad. Además, se verificó su homogeneidad de varianza por la prueba de Levene (Sokal & Rohlf, 1995). Al no presentar homogeneidad de varianza y normalidad, se realizó un análisis de varianza no paramétrico de comparaciones múltiples mediante la prueba de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias entre las medianas. Los análisis se realizaron con una probabilidad $P < 0,05$ en el programa Statistica 7.0 para Windows.

Finalmente, se evaluó el error que se comete al determinar el número de huevos en los nidos durante el monitoreo diurno (conteo después de la eclosión). Este análisis solamente se puede hacer cuando se cuenta el número de huevos durante la ovoposición y se hace un nuevo conteo en este mismo nido después de la eclosión de las crías, por lo que pudo realizarse solamente en las playas de Guanahacabibes donde se realiza monitoreo nocturno durante toda la temporada reproductiva. El número de huevos en la ovoposición se obtuvo por conteo directo, mientras que el total de huevos después de la eclosión se obtuvo a partir de la suma del total de cascarones y huevos sin eclosionar. Solamente se tuvieron en cuenta 428 nidos en los cuales se contaba con datos de los conteos en las dos etapas para un 20% del total de la anidación.

RESULTADOS

Nivel de cobertura de las áreas de anidación con monitoreo y tipo de monitoreo realizado por área

El establecimiento del Programa Nacional de Conservación de Tortugas Marinas en el año 2010 garantiza la existencia de monitoreo en el 100% de las regiones de importancia para la anidación de tortugas marinas en el archipiélago cubano (Tabla 1). En total se da seguimiento a la anidación en más de 40 playas y este nivel de seguimiento se ha mantenido desde 2010 hasta 2014. En la Tabla 1 se presenta el tipo de monitoreo realizado en las playas en cada una de las áreas de anidación analizadas.

El monitoreo nocturno sólo se realizó en cuatro de las playas de anidación del Parque Nacional Guanahacabibes, mientras que el monitoreo diurno esporádico con comprobación de nidos es el más extendido en el país (Fig. 2).

Cobertura de la temporada de anidación

En la Tabla 1 se presenta el porcentaje de las temporadas reproductivas de cada una de las especies que se logra cubrir durante el periodo 2010-2013, como una medida del esfuerzo realizado. También se presenta un segundo criterio del esfuerzo de monitoreo y es el estándar SWOT alcanzado por cada playa. La Tabla 1, la cobertura del monitoreo fue <50% en las tres especies y para la mayoría de las playas de anidación, aunque en estado más crítico se encuentra *E. imbricata* para la cual se cubrió <30% de la temporada en la mayoría de las áreas. El Sijú es la única playa donde se logró un 100% de cobertura o un porcentaje relativamente cercano a éste para las tres especies, debido a que el personal se encuentra todo el año en una estación en dicha playa que no es demasiado larga. En segundo lugar se encuentra el Parque Nacional Guanahacabibes donde se cubrió ~60% de la temporada reproductiva de *C. mydas* y *C. caretta* y en las playas índices y secundarias próximas gracias a un programa de voluntariado realizado en colaboración entre la Universidad de La Habana y el parque. Además, se realizó un importante esfuerzo en el área protegida de recursos manejados al sur de la Isla de la Juventud, aunque con variaciones entre algunas de las playas.

Detección de fallos en la anidación

En ambos tipos de monitoreo esporádico (MECC y MESC), prácticamente todos los rastros identificados correspondieron a nidos, y se diferenciaron significativamente del monitoreo sistemático que mostró mejor desempeño en la detección de rastros falsos (Fig. 3). En el monitoreo sistemático no se detectaron diferencias significativas entre los tipos diurno y nocturno, a pesar que en éste último el porcentaje fue <80% y el diurno ~85%.

Errores en la determinación del tamaño de la nidada

Un sesgo que se introduce en el monitoreo es la diferencia en el número de huevos que pone la tortuga con relación al número obtenido durante el análisis de los nidos luego de la eclosión. Solamente en el 41% de los casos se determinó correspondencia entre el número registrado durante la ovoposición y el del análisis de nidos post-eclosión (Fig. 4). El mayor porcentaje (49%) del resto de los nidos (que sí presentó diferencias en el número de huevos contabilizado en ambas etapas), co-

Tabla 1. Porcentaje de cobertura de la temporada reproductiva de las tres especies con anidación regular en el archipiélago cubano: caguama (*Caretta caretta*: Cc), tortuga verde (*Chelonia mydas*: Cm) y carey (*Eretmochelys imbricata*: Ei). Entre paréntesis la duración de la temporada de cada especie. MSN: monitoreo sistemático nocturno, MSD: diurno, MECC: monitoreo esporádico con comprobación de nidos y MESC: sin comprobación de nidos y en cuanto al estándar SWOT que alcanzan (L1: nivel 1, los estimados de abundancia tienen un error de muestreo menor del 20%; L2: nivel 2, los estimados de abundancia tienen un error de muestreo <20%). Sec: secundaria. *Solamente se informan los días de monitoreo porque es lo que diferencia a las playas ya que el número de personas por recorrido es similar (3 a 4).

Región	Playas	% de temporada reproductiva cubierta			Estándar SWOT			Tipo de monitoreo	Promedio anual de días de monitoreo*
		Cc (may-ago)	Cm (jun-sept)	Ei (oct-feb)	Cc	Cm	Ei		
Parque Nacional Guanahacabibes	Índices	57,5	57,5	5	L2	L1	L2	MSN	70
	Secundarias próximas	57,5	57,5	5	L2	L1	L2	MSD	30
	Secundarias remotas	30	30	5	L2	L1	L2	MECC	12
Parque Nacional Cayos de San Felipe	El Sijú (índice)	100	100	80	L1	L1	L1	MSD	110
	J. García (sec)	40	30	0	L1	L1	L1	MSD	10
	Real E (sec)	30	30	7,5	L2	L2	L2	MECC	15
	Real W (sec)	22,5	22,5	2,5	L2	L2	L2	MECC	15
	El Coco (sec)	2,5	2,5	0	-	-	-	MESC	1
Área Protegida de Recursos Manejados Sur de la Isla de la Juventud	Punta Francés (sec)	30	40	0	L1	L1	L2	MSD	10
	Guanal (índice)	50	50	0	L2	L1	L2	MSD	50
	Playa Larga (sec)	15	20	0	L2	L2	L2	MSD	5
	Punta del Este (sec)	50	50	0	-	-	-	MSD	15
Cayos al este de la Isla de la Juventud (Refugio de Fauna Campo-Rosario)	Todas las playas (sec)	2,5	2,5	0	L2	L2	L2	MESC	1
Cayo Largo	Todas las playas (sec)	2,5	2,5	0	L2	L2	L2	MESC	1
Refugio de Fauna Tunas de Zaza	Cayo Blanco (sec)	10	10	0	L2	L1	L2	MECC	5
	Majahuevo (secu)	10	10	0	L2	L1	L2	MECC	5
Refugio de Fauna Cayos de Ana María	Tío Joaquín (sec)	10	10	30	L2	L2	L2	MECC	10
	Las Canas (sec)	10	10	30	L2	L2	L2	MECC	10
Parque Nacional Jardines de la Reina	Playas índice	0	2,5	2,5	L2	L2	L2	MECC	2
	Cayo Caguama (sec)	30	30	40	L2	L2	L2	MECC	12
	Otras playas (sec)	0	2,5	2,5	L2	L2	L2	MESC	2
Refugio de Fauna Las Picúas-Cayo Cristo	Mulata (sec)	10	7,5	0	L2	L2	L2	MECC	8
	Obispo (sec)	10	7,5	0	L2	L2	L2	MECC	8
	Roteño (sec)	10	7,5	0	L2	L2	L2	MECC	8
Cayo Cruz	La Quebrada y Pta. Cocina (sec)	40	30	0	L1	L1	L2	MSD	12

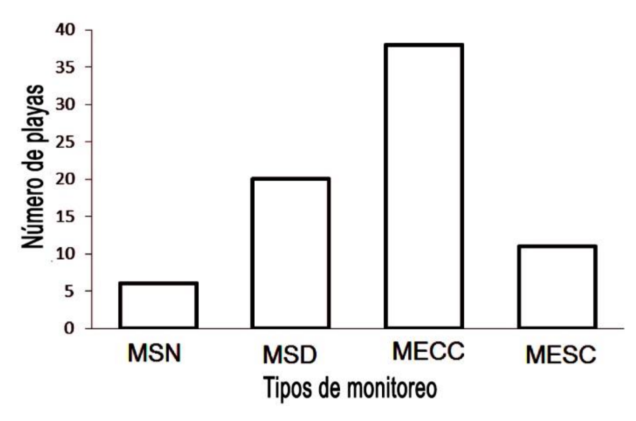


Figura 2. Representatividad por playas de los cuatro tipos de monitoreo realizados en áreas de anidación de tortugas marinas del archipiélago cubano. MSN: monitoreo sistemático nocturno, MSD: monitoreo sistemático diurno, MECC: monitoreo esporádico con comprobación de nidos, MESC: monitoreo esporádico sin comprobación de nidos.

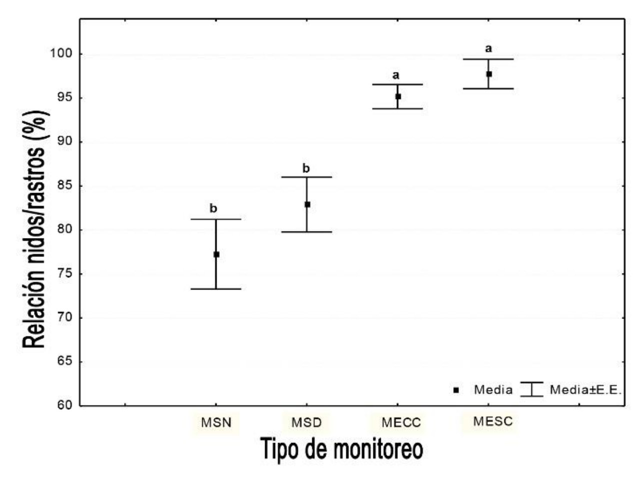


Figura 3. Porcentaje de rastros con nidos encontrados con relación a los rastros falsos en dependencia de la técnica de monitoreo empleada. MSN: monitoreo sistemático nocturno, MSD: monitoreo sistemático diurno, MECC: monitoreo esporádico con comprobación de nidos, MESC: monitoreo esporádico sin comprobación de nidos. Las letras indican los grupos estadísticamente homogéneos. Kruskal Wallis: $H_{(3;\ 158)} = 50{,}22$; $P < 0{,}05$.

rrespondió a una subestimación en la cantidad de huevos estimada en el análisis de nidos ya nacidos, es decir, que el valor obtenido en el análisis post-eclosión fue inferior al total de huevos registrado durante la puesta.

A pesar que existen diferencias entre el número de huevos obtenidos por las dos vías comparadas, éstas fueron en su mayoría <10 huevos (63% del total de nidos). No obstante, se debe señalar que, aunque en baja frecuencia (2%), se encontraron nidos con una diferencia

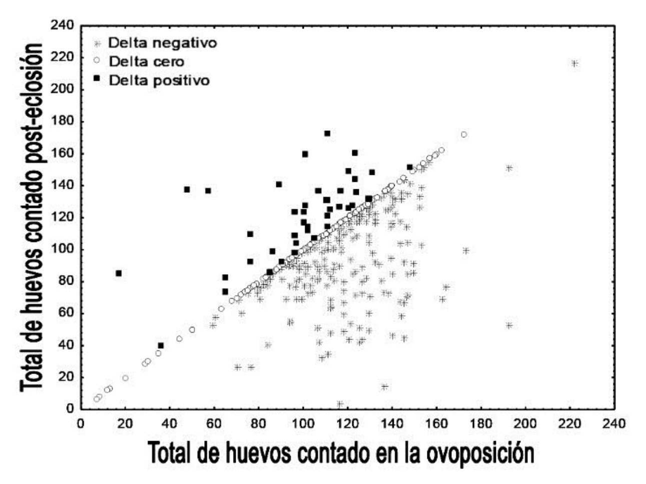


Figura 4. Relación entre el número de huevos contado durante la anidación y el registrado después del nacimiento de las crías (post-eclosión). Círculos blanco: nidos donde coincide el valor (delta cero), ■: nidos donde el número de huevos después del nacimiento de las crías fue mayor que el registrado en el momento de la anidación (delta positivo), *: nidos donde el valor registrado después del nacimiento de las crías fue menor al contabilizado en la anidación (delta negativo).

>90 entre el número de huevos registrados en la puesta y los estimados post-eclosión.

DISCUSIÓN

El tipo y esfuerzo de monitoreo en las playas de anidación de Cuba es variable y depende de factores como accesibilidad al área, presencia o no de personal permanente e infraestructura de apoyo para el monitoreo en el sitio, además de la disponibilidad de recursos adicionales tales como embarcaciones, combustible y alimentos para el trabajo de campo. En los monitoreos sistemáticos se realiza un mayor esfuerzo en cuanto al número de días efectivos en terreno, pues se cuenta con personal suficiente (contratado o voluntario) para que permanezca en las playas. No obstante, la cobertura no es equivalente para las tres especies de tortugas marinas ya que en la mayoría de las áreas, el período de anidación de *C. mydas* es el que recibe mayor atención. Las playas remotas, de difícil acceso y sin suficiente infraestructura y personal entrenado, como las del Parque Nacional Jardines de la Reina, las del refugio de fauna Campos-Rosario y las de Cayo Largo, entre otras, tienen consecuentemente bajo esfuerzo de monitoreo debido a las complicaciones logísticas y costos de su realización. En las playas con escasa anidación el esfuerzo de monitoreo es bajo, aunque suficiente en la mayoría de los casos, puesto que no requiere un patrullaje intensivo para determinar la magnitud de la

anidación. Cayo Largo es el área con la mayor densidad de anidación en Cuba con cerca de 1.500 nidos por año (Medina *et al*., 2009). Sin embargo, el monitoreo se realiza sin comprobación de nidos, por lo que se requiere desarrollar un diseño de muestreo para determinar factores de corrección que permitan estimaciones más precisas de las características de la anidación en este importante sitio.

La diferenciación en el esfuerzo es uno de los factores que influye en los resultados obtenidos en el monitoreo, y que debe ser considerado en su interpretación. Fish *et al.* (2005) plantean que fue imposible distinguir entre los rastros falsos y los verdaderos nidos debido a que el monitoreo se hizo de día. Según Schroeder & Murphy (2000), los errores pueden ser mayores en playas de anidación con densidades moderadas a altas, como ocurre en Cayo Largo, ya que la gran cantidad de huellas dificulta la interpretación de las señales dejadas por las tortugas. Estos autores sugieren, en el caso de censos del número total de rastros, que debe desarrollarse un factor de corrección para estimar rastros con nido y sin nido o "rastros falsos". Esto sería importante sobre todo en áreas donde se realiza monitoreo esporádico sin comprobación de nidos, aunque los problemas logísticos hacen muy difícil un estudio de esta índole. Otros elementos que inciden negativamente en la detección de los nidos es que la probabilidad de ser depredados aumenta con el paso de los días (Leighton *et al*., 2010) o pueden resultar inundados y desaparecer (Fish *et al*., 2005).

La única manera de confirmar la presencia de huevos es verlos durante el desove, después de excavar o explorar el nido, o como resultado de las actividades de los depredadores. Con el tiempo, las señales distintivas del nido se vuelven más difíciles de observar por lo que los monitoreos esporádicos tienen mayor probabilidad de subestimar la anidación, más aún si no se verifican los nidos. Según Schroeder & Murphy (2000), bajo ciertas condiciones de la playa y para algunas especies, los observadores con suficiente entrenamiento o experiencia pueden identificar las señas de campo o "huellas" de la tortuga que emergió y depositó los huevos. Por otro lado Azanza *et al*. (2013), plantean que aunque el monitoreo sin comprobación de nidos no asegura que haya 100% de certeza en el número de nidos, en Cuba solo se realiza por personal altamente calificado y vasta experiencia de campo, lo que reduce el margen de error en el monitoreo. Independientemente de la metodología utilizada para el monitoreo diurno, debe generarse una estimación del error del muestreo, y aplicarse como factor de corrección en el análisis final del nivel de anidación.

La contabilidad total de las salidas de las tortugas con evento de anidación o no-anidación, demanda un monitoreo cotidiano a lo largo de toda la temporada. Sin embargo, el monitoreo diario no siempre es necesario o logísticamente posible y pueden usarse datos de prospecciones o recorridos intermitentes al área de anidación, como un índice de las anidaciones totales (Schroeder & Murphy, 2000). Esto es lo que sucede en la mayor parte de las áreas de monitoreo del programa nacional, especialmente en el Parque Nacional Jardines de la Reina, donde se requiere un rediseño del sistema de trabajo para, en lugar de intentar censos, se realice un muestreo estadísticamente robusto que permita posteriormente su procesamiento con modelos para estimar la abundancia total, como el de Girondot, que recomienda SWOT (2011). Según Azanza *et al.* (2013) esta área es la más inaccesible y difícil de trabajar, lo que ha resultado en una menor frecuencia de monitoreo.

En general la cobertura de la temporada de anidación es <60% en todas las áreas, excepto en la playa El Sijú, donde se logra cubrir el 100% de la temporada reproductiva de dos de las tres especies analizadas. *E. imbricata* es la especie que se encuentra en mayor desventaja en todas las áreas bajo monitoreo debido a que anida de forma dispersa y durante todo el año, lo cual determina que muy pocas áreas de monitoreo cumplan los estándares internacionales de SWOT y se encuentren clasificadas como L2.

La relativa eficiencia en el monitoreo efectuado se hace evidente en las pocas diferencias encontradas entre el número de huevos registrados durante el análisis post-eclosión y los que se registraron durante la ovoposición (<10 huevos en el 63% de los nidos). El hecho que en la mayoría de los casos en los que se encontraron diferencias, la cantidad de huevos detectada en el análisis post-eclosión, estuvo bajo el número contabilizado durante la ovoposición, se debe fundamentalmente a que no se excavó la totalidad del nido o a que la consistencia de la arena causó derrumbes sucesivos lo que impidió que se hallara la totalidad de los cascarones y huevos. El número de huevos también puede ser menor si ocurre un proceso erosivo, el nido es depredado o parte de los huevos son removidos durante la anidación de otras tortugas.

Debe hacerse notar que, aunque en menor medida, también se observaron casos de sobreestimación. Esto se debe posiblemente a que se contabilizaron de manera incorrecta los cascarones, al no considerar solamente aquellos con más del 60% de la cáscara completa, lo que depende de la pericia del observador que realiza el conteo y su habilidad para excavar el nido y evitar romper aún más los cascarones. En cualquiera de los casos se debe ser cuidadoso para minimizar los errores que puedan sesgar los análisis biológicos que se realicen y las caracterizaciones de las poblaciones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que es necesario desarrollar nuevas estrategias que garanticen la correcta toma de información, al menos, en las áreas de anidación más importantes del país. También es necesario hacer más eficiente el programa de monitoreo para obtener la mayor información posible de cada una de las especies con un adecuado balance de costo-beneficio. Para asegurar una muestra objetiva, siempre que las condiciones lo permitan, es necesario realizar censos de la anidación varias veces a lo largo de la temporada. Cuando no sea posible realizar censos frecuentes se sugiere realizar estimaciones de la anidación total mediante la aplicación de modelos. Por otro lado, sin información sobre el número de puestas por hembra y su periodicidad es imposible determinar el tamaño de la población anidadora simplemente por el conteo de nidos (Frey *et al.*, 2013). Por ello se debe intentar el establecimiento de un período de censo nocturno al menos durante el máximo de la anidación, para contar con la información relacionada con las hembras anidadoras.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), Ocean Foundation y al proyecto GEF-PNUD "Archipiélagos del Sur de Cuba" por su apoyo financiero, logístico y equipamiento para el desarrollo del monitoreo en las áreas protegidas del país. A las administraciones de las áreas protegidas donde se realizó el monitoreo. A los gobiernos locales, al Cuerpo de Guardabosques, la ODIG y entidades del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente y de la Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna por su apoyo logístico y las autorizaciones requeridas. Finalmente, a los trabajadores de la conservación y voluntarios que, en arduas y prolongadas jornadas de monitoreo, recopilaron en el campo la mayor parte de los datos analizados. A todos ellos nuestro más sincero agradecimiento.

REFERENCIAS

Azanza, J., F. Moncada, J. Gerhartz, Y. Forneiro, Y. Medina, G. Nodarse & A. Gerhartz. 2013. Monitoreo y conservación de las tortugas marinas en Cuba: mayo 2010-febrero 2012. Informe del Programa Cubano de Tortugas Marinas, del Programa de Conservación Marina de WWF en Cuba y del proyecto GEF-PNUD Archipiélagos del Sur. La Habana, 55 pp.

Antworth, R.L., D.A. Pikea & J.C. Stinera. 2006. Nesting ecology, current status, and conservation of sea turtles on an uninhabited beach in Florida, USA. Biol. Conserv., 130: 10-15.

Balazs, G.H. 1999. Factors to consider in the tagging of sea turtles. In: K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois & M. Donnelly (eds.). Research and management techniques for the conservation of sea turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication, 4: 101-114.

Block, B.A., D.P. Costa, G.W. Boehlert & R.E. Kochevar. 2003. Revealing pelagic habitat use: the tagging of Pacific pelagics program. Oceanol. Acta, 25: 255-266.

Broderick, A.C., F. Glen, B.J. Godley & G.C. Hays. 2003. Variation in reproductive output of marine turtles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 288: 95-109.

Cheng, I. 2002. Ten-years research and conservation on the green sea turtle refuge site at Wan-An Island, Peng-Hu Archipelago, Taiwan, R.O.C. Paper presented at the IUCN/WCPA-EA-4 Taipei Conference, Taipei, pp. 335-342.

Fish, M., I.M. Coté, J.A. Gill, A.P. Jones, S. Renshoff & A.R. Watkinson. 2005. Predicting the impact of sea-level rise on Caribbean sea turtle nesting habitat. Conserv. Biol., 19(2): 482-491.

Frazer, N.B. & L.M. Ehrhart. 1985. Preliminary growth models for green, *Chelonia mydas*, and Loggerhead, *Caretta caretta*, turtles in the wild. Copeia, 1985(1): 73-79.

Frey, A., P.H. Dutton & G.H. Balazs. 2013. Insights on the demography of cryptic nesting by green turtles (*Chelonia mydas*) in the main Hawaiian Islands from genetic relatedness analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 442: 80-87.

Hawkes, L.A., A.C. Broderick, M.H. Godfrey & B.J. Godley. 2007. Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. Glob. Change Biol., 13: 1-10.

Leighton, P.A., J.A. Horrocks & D.L. Kramer. 2010. Predicting nest survival in sea turtles: when and where are eggs most vulnerable to predation? Anim. Conserv., 14: 186-195.

Medina, Y., F. Moncada, G. Nodarse & R. Blanco. 2009. Anidación de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) y caracterización de las playas en Cayo Largo, Cuba. Rev. Invest. Pesq., 26(1): 66-72.

Moncada-Gavilán, F., J. Azanza-Ricardo, G. Nodarse-Andreu, Y. Cruz, Y. Forneiro Martín-Viaña & J.L. Gerhartz-Muro. 2013. Protocolo para el monitoreo de la anidación de tortugas marinas en Cuba. Grupo Nacional para la Conservación de las Tortugas marinas en Cuba. Proyecto GEF/PNUD "Aplicación de un enfoque regional al manejo de las áreas marino-costeras protegidas en la Región Archipiélagos del Sur de Cuba". La Habana, Cuba. ISBN-978-959-287-045-1, 84 pp.

Schroeder, B. & S. Murphy. 2000. Prospecciones poblacionales (terrestres y aéreas) en playas de anidación. In: K.L. Eckert, K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois & M. Donnelly (eds.). Técnicas de investigación y manejo para la conservación de las tortugas marinas. UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas Publicación, 4: 51-63.

Received: 9 April 2014; Accepted: 24 March 2015

Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman, New York, 937 pp.

SWOT. The State of the World's Sea Turtles. 2011. Scientific Advisory Board. Minimum Data Standards for Nesting Beach Monitoring, version 1.0. Handbook, 3: 28 pp.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 557-565, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-17

Research Article

Aplicación de modelos lineales mixtos en infecciones experimentales con WSSV en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

María Alejandra Ramírez-Ruiz[1], Raúl Simá-Álvarez[1]
Edgar Torres-Irineo[2] & Rossanna Rodríguez-Canul[1]
[1]Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN Unidad Mérida), Antigua Carretera a Progreso km 6
A.P. 73 "Cordemex", C.P. 97310, Mérida, Yucatán, México
[2]Laboratorio de Pesquerías, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV - IPN Unidad Mérida), Antigua Carretera a Progreso km 6
A.P. 73 "Cordemex", C.P. 97310, Mérida, Yucatán, México
Corresponding author: Rossanna Rodríguez-Canul (rossana@mda.cinvestav.mx)

RESUMEN. El virus de la mancha blanca (WSSV) es uno de los virus más devastadores en la industria camaronícola. Hasta la fecha no se ha hallado una cura para la enfermedad por lo que es necesario diseñar protocolos experimentales reproducibles y medibles para evaluar fármacos y respuestas fisiológicas de los organismos durante la prognosis de la infección. En este estudio se evaluaron dos vías de infección (inyección e inmersión) con WSSV (200 copias de ADN) a temperatura constante de 26 ± 0,5ºC, en juveniles *Litopenaeus vannamei* (4,8 ± 0,38 g) en estado de inter-muda. En la infección por inyección se observó nado errático, letargia y coloración rojiza a partir de las 24 h y la mortalidad fue del 100% a los 2-5 días: en 63% de los organismos se observó infección ligera [20 copias de ADN y 1-5 cuerpos de inclusión intranuclear (CAI)/200 campos], 21% con infección moderada (200 copias de ADN y 1-2 CAI/20 campos) y 16% con infección severa (2000 copias de ADN y más de 10 CAI/campo). No se observó mortalidad en los organismos controles. En la infección por inmersión, los signos de la enfermedad se observaron a partir del día 3, en un período de 3-9 días se observó 38% de mortalidad: 25% con infección ligera (20 copias de ADN y 1-2 CAI/20 campos), 5% con infección moderada (200 copias de ADN y 1-2 CAI/ 20 campos) y 8% con infección severa (2000 copias de ADN y 1-5 CAI/2 campos). El 62% que sobrevivió, fue PCR positivo, con grado de infección ligera (20 copias de ADN) pero sin inclusiones CAI. No se observó mortalidad en el grupo control. Los datos recabados no cumplían con los supuestos de independencia y linealidad requeridos para la aplicación de análisis de varianza por lo que se usaron los modelos lineales mixtos donde se observó mayor precisión y capacidad de predicción. En los organismos inyectados la mortalidad tuvo su máximo más alto al día 5 después de la inoculación. Mientras que en los infectados por inmersión la mortalidad más alta se presentó al noveno día posterior a la infección. El análisis de varianza de Kenward-Roger indica diferencias significativas en los días transcurridos ($F = 20,1$; $P = 0,001$), al igual que las vías de infección (análisis Random) ($P = 0,007$).

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, modelos lineales mixtos, WSSV, acuicultura.

Implementation of the mixed linear models in experimental infections with WSSV in the withe shrimp *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT. The White Spot Syndrome Virus has been very detrimental for the shrimp industry. Up to date there is no cure for the disease, thus, it is necessary to implement reliable experimental strategies to evaluate the effect of drugs and the host response during the prognosis of the disease. In this study, we evaluated two ways of infection with WSSV (200 copies WSSV-DNA) (injection and immersion), at constant temperature (26 ± 0.5ºC), in juveniles of *Litopenaeus vannamei* (4.8 ± 0.38 g) in intermolt stage. In the infection by injection, the organisms were lethargic with reddish appearance 2 days after infection and mortality (100%) was observed within 2-5 days: 63% organisms with light degree of infection [20 copies of DNA & 1-5 Cowdry A-type inclusions in hypertrophied nuclei (CAI)/200 fields], 21% had moderate infection (200 copies of DNA & 1-2

Corresponding editor: César Lodeiros

CAI/20 fields) and 16% severely infected (2000 copies of DNA & more than 10 CAI/field). No mortality was observed in the controls. In the infection by immersion, the signs of WSSV were observed 3 days after infection: 38% of mortality was observed during 3-9 days: 25% of the organism with light degree of infection (20 copies of DNA & 1-2 CAI/20 fields), 5% moderately infected (200 copies of DNA & 1-2 CAI/20 fields) and 8% with severe infection (2000 copies of DNA & 1-5 CAI/2 fields. The other 62% organisms were necropsied at day 12 and tested positive to the WSSV-PCR (light infection = 20 copies of DNA), but did not show CAI by histology. No mortality was observed in the controls. For the statistical analysis, the data did not fit the criteria of independence and linearity needed for the analyses of variance, thus we used instead the mixed linear models and were able to observe a better prediction: in the injected organisms, the mortality reached the highest peak at day 5 after infection. In the organisms infected by immersion, the highest peak or mortality was observed at day 9 after infection. The analysis of variance of Kenward-Roger indicated significant differences between the days of mortality (F = 20.1, P = 0.001), as well as among the ways of infection (Random analysis) (P = 0.007).

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, mixed linear models, WSSV, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

La industria camaronícola ha sido gravemente afectada por el virus de doble cadena denominado de la mancha blanca (White Spot Syndrome Virus-WSSV). La enfermedad es altamente contagiosa y letal. Se transmite de forma vertical y horizontal, siendo esta última por ingestión de tejido infectado, canibalismo, fluido de organismos infectados y por contacto a través de la columna de agua (Rahman *et al*., 2006). Los signos clínicos de WSSV son letargia, nado errático, coloración rojiza por expansión de los cromatóforos, anorexia, presencia de manchas blancas en el caparazón y muerte en un corto periodo (Itami *et al.*, 1998).

Debido al potencial devastador del virus y a que no se ha podido erradicar, se han implementado diversos modelos experimentales en infecciones controladas para evaluar estrategias de mitigación. En esas condiciones, se ha observado que la amplificación de la carga viral y la aparición de la enfermedad puede ser potenciada por estrés ambiental asociada a cambios bruscos de temperatura y a condiciones fisiológicas de los organismos (Lotz *et al*., 2005; Sánchez-Martínez *et al*., 2007). Se ha observado que el virus puede permanecer latente en el medio en un rango 15-22ºC (Rahman *et al*., 2007), mientras que a temperaturas >32ºC existe un bajo índice de replicación viral (Rahman *et al*., 2008). A temperatura constante de 32-33°C, antes y después de la inoculación con WSSV, no se observan signos clínicos (Vidal *et al*., 2001; Rahman *et al*., 2006). Mientras que el rango 22-30ºC, es propicio para la replicación viral (Jiravanichpaisal *et al*., 2006). Rahman *et al.* (2007) evaluaron varias cepas de WSSV a dosis bajas de inóculo y a temperatura constante de 27ºC: los signos clínicos de WSSV aparecieron en 24 a 36 h post-infección y a las 60 h se observó 100% de mortalidad corroborando que la temperatura es un factor que propicia la infección a pesar de ser cepas distintas.

También se ha evaluado la vía de inoculación viral a través de la ingesta de tejido infectado, por inyección intramuscular y por inmersión en la columna de agua (Prior *et al.*, 2003; Soto & Lotz, 2003). El ciclo de muda y la presencia de heridas en la cutícula de los camarones puede ser otro factor de riesgo asociado a la infección con WSSV ya que los organismos en etapa de post-muda fueron más susceptibles durante la infección por inmersión (Corteel *et al*., 2009).

A pesar de los grandes avances sobre la biología de WSSV, aún existe la necesidad de contar con diseños experimentales reproducibles, con datos que sean estadísticamente robustos, donde se pueda analizar las observaciones con respecto al tiempo. En este sentido, el modelo lineal mixto se utiliza en análisis longitudinales, es decir, en estudios diseñados para investigar cambios en el tiempo, en una característica medida repetidamente para cada individuo en el experimento (Laird & Ware, 1982). Este enfoque de modelación es muy efectivo en situaciones donde los datos no presentan una distribución normal, igualdad de varianzas, independencia y linealidad, lo que limita la aplicación de modelos lineales clásicos (Dichmon, 2004; Venables & Dichmont, 2004).

Dos características a resaltar de los modelos mixtos es que están presentes los efectos fijos y los aleatorios, donde los primeros permiten modelar conjuntos de datos donde las observaciones no son independientes (Douglas *et al.*, 2013). Los efectos aleatorios cuantifican la variación entre y dentro de los grupos de unidades. Estas unidades corresponden a bloques en experimentos o estudios de observación replicados a lo largo del tiempo (Bolker *et al*., 2009). Este análisis aplicado adecuadamente, da mayor validez a las conclusiones debido a que posee mayor precisión en la estimación de los parámetros del modelo de análisis y mejora la potencia de la prueba (Fernández & Vallejo, 1996; Douglas *et al.*, 2013).

Este modelo lineal mixto es actualmente uno de los más utilizados en la investigación médica, social,

psicológica y recientemente agropecuaria (Fernández & Vallejo, 1996: Gómez *et al*., 2012).

Con base en lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar dos vías de infección experimental (inmersión e inyección) con WSSV, en juveniles de *Litopeaneus vannamei* en etapa de post-muda. El bioensayo se realizó en un sistema con temperatura controlada y el análisis estadístico fue sustentado por un modelo lineal mixto, utilizado para analizar los diseños de medidas repetidas en un intervalo de tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aclimatación de animales experimentales

Se utilizaron camarones juveniles de *Litopeaneus vannamei* provenientes de una granja comercial, con una talla promedio de 4,8 ± 0,38 g. Previo al ensayo, se tomaron al azar 10 organismos para detectar WSSV por histopatología y PCR anidada (IQ2000™). Los camarones del mismo lote se aclimataron en el laboratorio durante 8 días en un estanque de fibra de vidrio con capacidad de 200 L con agua de mar, aireación constante y fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Se estableció la ración diaria de alimento con Camaronina de Purina® (35%).

Preparación del inóculo viral (WSSV)

El inóculo viral se obtuvo del tejido muscular congelado de camarones infectados con WSSV del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida. Para el inóculo viral se homogenizó el tejido con solución amortiguadora de fosfatos PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $NaH_2PO_4H_2O$ 10 mM, K_2HPO_4 2 mM, pH 7,4) previamente esterilizado, en una relación 3:10, se centrifugó a 10.000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se pasó por una membrana de 0,45 µm y se evaluó por PCR anidada (IQ2000™) el grado de infección viral.

Diseño experimental (pruebas de inyección e inmersión)

Después de corroborar que los 10 individuos analizados estuvieron libres de WSSV, se seleccionaron organismos en etapa de post-muda que son más susceptibles a la infección (Corteel *et al*., 2009). El bioensayo se realizó por inyección e inmersión en estanques de plástico de 40 L de agua de mar y con 8 camarones por estanque que se distribuyeron en tres réplicas para cada tratamiento y para sus controles respectivamente. Los camarones recibieron alimento comercial (Camaronina de Purina) en raciones diarias del 3% de la biomasa total. Diariamente se midieron los parámetros de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad (YSI-85, Modelo 85-10 FT), pH y cada tres días el amonio y nitritos.

En el reto por inyección, los organismos se infectaron con 30 µL del inóculo viral (WSSV) por punción en la unión del quinto par de pereiópodos utilizando jeringas para insulina estériles (1 mL^{-1}, 27G x 13 mm). Mientras que en el reto por inmersión los organismos se sumergieron por 6 h en recipientes que contenían agua de mar con 2% del inóculo viral (Corteel *et al*., 2009).

Posteriormente, estos se transfirieron a estanques de 40 L con agua de mar y aireación constante durante el experimento. A los organismos utilizados como control para ambas pruebas, se les realizó el mismo procedimiento sustituyendo el inóculo viral por PBS.

Diagnóstico de la enfermedad (PCR anidada e histopatología)

La PCR anidada se realizó en hepatopáncreas, branquia y músculo, fijados con etanol al 70%. La prueba se realizó con el kit comercial IQ 2000™ para WSSV (PCR TECH), que detecta fragmentos de ADN del genoma de WSSV y se basa en una prueba directa de PCR semi-cuantitativa. Se puede distinguir cuatro diversos niveles de infección: no infectado, infección ligera (20 copias de ADN), moderada (200 copias de ADN) y severa (2000 copias de ADN), que contiene un control interno que identifica actina de camarón y un estándar positivo que es cuantificable de acuerdo a la severidad de la infección. Desde 1998, este sistema es utilizado en numerosas granjas alrededor del mundo como el método más preciso y eficaz para la detección de diversos tipos de WSSV distribuidos en diferentes regiones del mundo.

De igual forma se fijaron muestras de branquias, hepatopáncreas, estómago, intestino y músculo en solución Davidson's (48 h) y después en alcohol al 70%, que fueron procesados y teñidos con hematoxilina-eosina, siguiendo el procedimiento descrito por Bell & Lightner (1988). Las muestras se examinaron al microscopio Olympus BX50/Nomarski, adaptado con una cámara Evolution MP Cooled, Media Cybernetics. Se utilizó la nomenclatura de Lightner (1996), para clasificar los grados de infección según el número de cuerpos de inclusión basofílicos e intracelulares denominados Cowdry tipo A (CAI): Grado 0 = organismos sin infección. Grado 1 = de 1-5 CAI/200 campos, infección ligera. Grado 2 = 1-2 CAI/20 campos, infección ligera a medianamente severa. Grado 3 = 1-5 CAI/2 campos, infección aguda. Grado 4: >10 CAI/campo, severo usualmente letal.

Análisis estadístico

Inicialmente se aplicaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnof) y homocedasticidad (test de Levene) para conocer la naturaleza de los datos. Posteriormente, para evaluar si existieron diferencias entre los organismos debido a los dos tipos de infección (inyección *vs* infección), se usó un modelo lineal mixto, para mediciones repetidas en el tiempo, con efectos fijos y aleatorios combinados.

En este caso se utilizó el número de inclusiones virales (CAI) como variable de respuesta, en el efecto fijo se consideraron los días transcurridos y el efecto aleatorio en las vías de infección aplicadas (inyección *vs* infección):

$$Y_i = \gamma_{00} + \gamma_{01} T_i + (u_{0i} + e_i)$$

donde Y_i es el número de inclusiones virales (CAI) en los camarones del tratamiento i (inyección *vs* infección); γ_{00} es el intercepto general; γ_{01} es el coeficiente del efecto fijo; T_i los días transcurridos (efecto fijo). Los efectos aleatorios correspondieron a cada vía de infección u_{0i} y el componente residual asociado e_i.

Las diferencias entre vías de infección fueron validadas mediante un análisis de varianza al modelo mixto, donde el valor de *P* se basa en el método de Kenward-Roger (Kenward & Roger, 1997) y el análisis de los efectos aleatorios. Este análisis fue implementado utilizando el paquete estadístico lme4 (Bates *et al*., 2013) del programa computacional libre R (R Core Team, 2013).

RESULTADOS

Durante la medición de los parámetros en los estanques del bioensayo, la temperatura del agua se mantuvo a 26 ± 0,5°C, la salinidad a 36 y el oxígeno disuelto a 5 ± 0,5 mg L^{-1}, el pH varió de 7,7-8,0. Los nutrientes se encontraron bajo los niveles permitidos, los nitritos 0,3 mg L^{-1} y el amonio ≤1,5 mg L^{-1}.

El inóculo viral utilizado para el reto, dio positivo para WSSV con infección moderada (200 copias de ADN). En la infección por inyección, los individuos mostraron signos de WSSV como nado errático, letargia y coloración rojiza a las 24 h post-infección. La mortalidad acumulada fue de 100% en los días 2-5 post-infección. No se observó mortalidad en los organismos de los controles inyectados con PBS (Fig. 1).

En el diagnóstico de la enfermedad, todos los individuos inyectados resultaron positivos para WSSV: se detectaron 63% con infección ligera (20 copias ADN), 21% con infección moderada (200 copias de ADN) y 16% con infección severa (2000 copias de ADN).

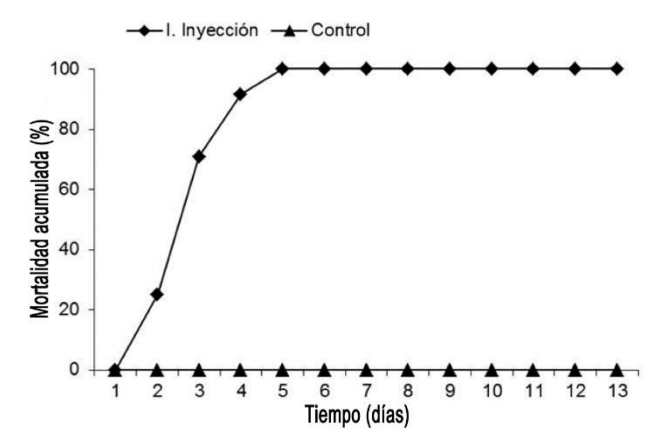


Figura 1. Porcentaje de mortalidad acumulada en camarones *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV vía inyección (■). Los controles no presentaron mortalidad (▲).

En la infección por inmersión, los signos de la enfermedad y la mortalidad se observaron al tercer día post-infección. A diferencia de los individuos inyectados, ésta fue lenta y paulatina y continuó así hasta el noveno día. El porcentaje de mortalidad acumulado obtenido fue de 38% (Fig. 2).

La PCR anidada dio positiva a WSSV para todos los organismos muertos en estas condiciones. La variabilidad en los grados de infección fue de 25% con infección ligera (20 copias de ADN), 5% con infección media (200 copias de ADN) y 8% con infección severa (2000 copias de ADN). Los sobrevivientes a esta vía de infección (62%) fueron PCR positivo, con grado de infección ligera (20 copias de ADN) pero sin inclusiones CAI por histología (Fig. 3). No hubo mortalidad en los controles.

Tanto en los tratamientos por inyección como por inmersión, la PCR anidada detectó más organismos con infección ligera. Siendo esta técnica más sensible al analizar las muestras de hepatopáncreas y branquias.

En cuanto al análisis histopatológico, para la prueba de inyección, se observó la presencia de cuerpos de inclusión intranuclear Cowdry tipo A característicos de WSSV en branquia, con grado de infección ligera (1-5 CAI/200 campos) (Fig. 4).

En el tratamiento por inmersión, mediante el análisis histológico se observó un mayor número de CAI con grado 2 de severidad (1-2 CAI/20 campos en branquias y estómago) (Fig. 5). El órgano blanco en esta prueba fueron las branquias y estómago. En los organismos sobrevivientes no se encontraron CAI en los tejidos analizados. En los controles de ambos tratamientos (inyección e inmersión) no hubo mortalidad y se confirmó que fueron negativos a WSSV respectivamente.

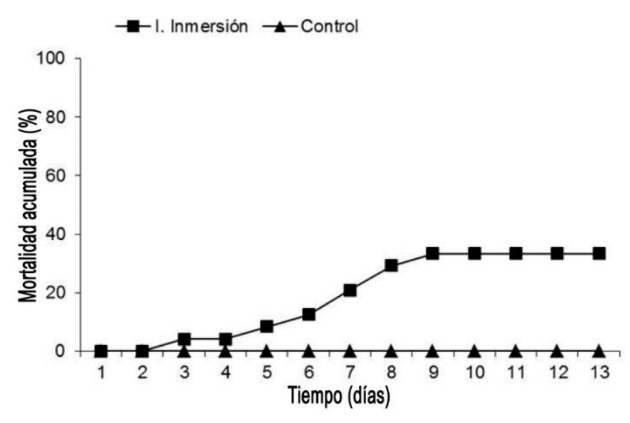


Figura 2. Porcentaje de mortalidad acumulada en organismos de *Litopenaeus vannamei* infectados con WSSV vía inmersión (■). Los controles no presentaron mortalidad (▲).

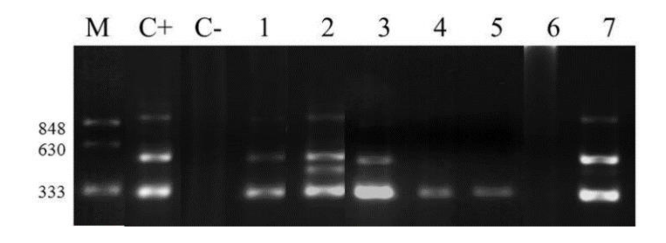


Figura 3. Niveles de infección de WSSV obtenidos en la PCR anidada realizada con el kit comercial IQ 2000™ para WSSV (M: marcador, C+: control positivo, C-: control negativo, Líneas (L) 1 y 3: infección moderada (200 copias ADN), L2 y L7: infección severa (2000 copias ADN), L4 y 5: infección ligera (20 copias ADN), L6: muestra negativa.

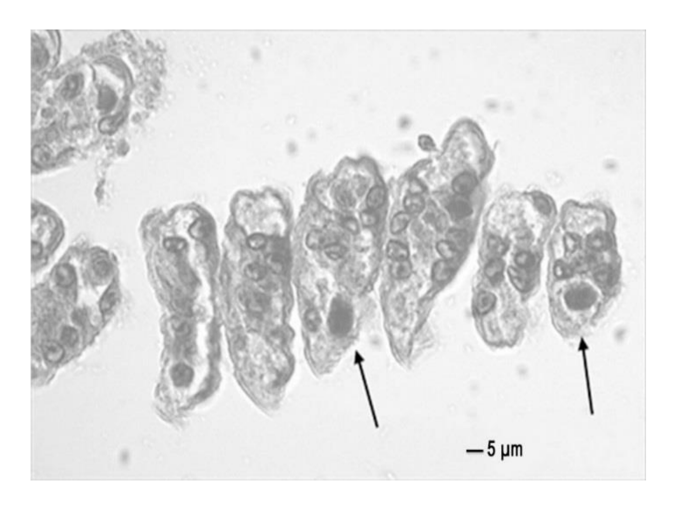


Figura 4. Corte histológico de branquia de *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV. Presencia de cuerpos de inclusión Cowdry tipo A, con infección grado 1 (40x).

Al comparar a los ejemplares muertos para cada método de infección, se observaron diferencias significativas. En los organismos inyectados la mortalidad tuvo su máximo al quinto día después de la inoculación y se observó un comportamiento similar entre replicas. Mientras que en los infectados por inmersión la mortalidad más alta se presentó al noveno día posterior a la infección, observándose diferencias entre replicas (Fig. 6).

El análisis de varianza de Kenward-Roger indicó diferencias significativas en los días transcurridos (F = 20,1, P = 0,001), al igual que las vías de infección (análisis de Random) (P = 0,007).

DISCUSIÓN

En las infecciones experimentales de camarones peneidos uno de los factores importantes a considerar es la vía de aplicación del inóculo viral, ya que el exceso en su manipulación podría generar estrés en los organismos tratados, lo cual a su vez puede propiciar errores al analizar los datos. La factibilidad del método también es importante a la hora de realizar los bioensayos ya que la infección individual por inyección podría resultar inoperable cuando se maneja un gran número de ejemplares. Sin embargo, la mayoría de los investigadores recomiendan las infecciones intramusculares, ya que con este procedimiento se asegura tener un mayor control en la dosis y el tiempo de exposición del virus al organismo, a diferencia de la administración oral donde es difícil calcular el consumo de tejido de camarones infectados (Huang *et al*., 2011).

La desventaja que se observa con la infección intramuscular, es que se rompe la primera barrera natural de defensa (cutícula) de los organismos, de tal forma que el sistema inmune se ve comprometido por el estrés generado por la punción y manipulación de los ejemplares, provocando alteraciones fisiológicas que pudieran influir en los resultados de los bioensayos cuando se pretende medir su estado de salud (Corteel *et al*., 2009, 2012). Además, el virus inoculado ingresa directamente a la hemolinfa del hospedero llegando a su tejido en un tiempo muy corto, generando la infección en cuestión de horas (Rahman *et al.*, 2006). Por otro lado, la infección por inmersión, es una técnica muy flexible que igual se puede aplicar tanto para larvas como para camarones adultos y puede realizarse en grupos numerosos, además de reducir la manipulación y por consiguiente el estrés por manejo de los ejemplares (Corteel *et al*., 2009), y también a reducir errores en las mediciones de los datos, aquí el proceso de infección resulta más lento y similar a un brote de infección natural en un estanque de cultivo (Chien, 1992; Wongmaneeprateep *et al*., 2010).

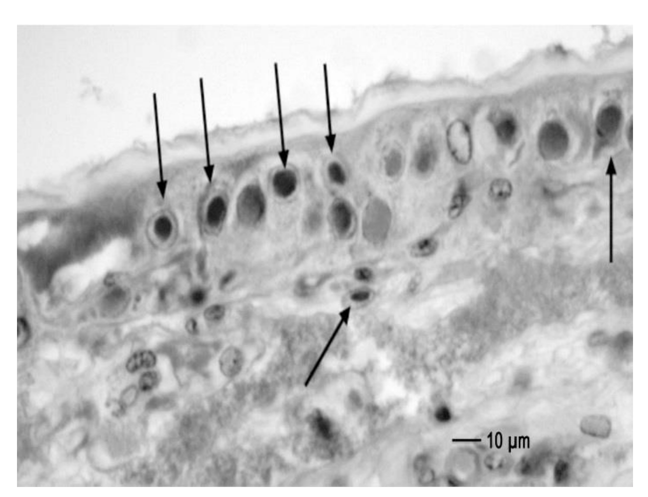


Figura 5. Corte histológico de epitelio estomacal de *Litopenaeus vannamei* infectado con WSSV con infección grado 2 (40x). Los CAI se señalan con flechas.

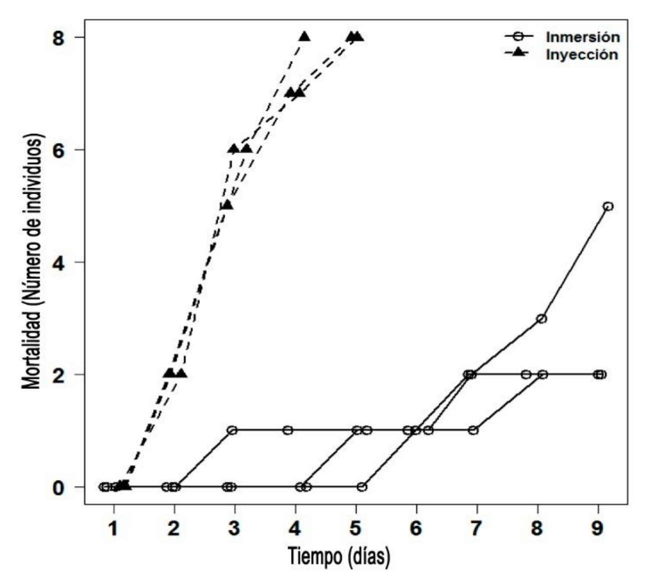


Figura 6. Número de organismos muertos en función de los días transcurridos durante la infección (inyección *vs* inmersión). Tanto los días como las vías de infección fueron significativos. Cada curva corresponde a una réplica de cada tratamiento. Organismos inyectados con el virus (---) y aquellos en el que el virus fue puesto en el agua (—).

Durante este estudio, la medición de los niveles de nutrientes y parámetros ambientales se mantuvo dentro de los intervalos recomendados para el cultivo de larvas de camarón (Boyd, 1989; Chien, 1992; Gitterle *et al*., 2006). Se tomó especial cuidado en controlar la temperatura de los estanques y que los ejemplares estuviesen en etapa de post-muda, como factores de riesgo que promuevan la replicación del virus WSSV (Corteel *et al*., 2009, 2012).

La mortalidad en la inmersión (38%) fue menor a la inyección (100%), durante los 13 días que duró el bioensayo. El 62% de los ejemplares sobrevivientes fueron positivos a la PCR con grado de infección ligero (20 copias de ADN) pero sin la presencia de CAI por histopatología. Con esta alternativa de infección se abren más posibilidades de evaluar el sistema inmune de los organismos infectados experimentalmente con WSSV.

Uno de los objetivos de este trabajo fue utilizar el modelo lineal mixto para el análisis de los datos para promover su aplicación en acuicultura. Puesto que, en numerosas investigaciones sobre inoculaciones inducidas, los diseños experimentales con medidas repetidas en el tiempo en un mismo sistema pueden originar que estén correlacionadas entre sí y no cumplan con el supuesto de independencia, igualdad de varianza, normalidad y linealidad (Fernández & Vallejo, 1996). En este contexto es difícil utilizar modelos lineales clásicos para el análisis de varianza. Pero esta situación deja de ser un problema cuando se aplica adecuadamente un análisis que acentúe la validez de las conclusiones estadísticas (Gómez *et al.*, 2012).

Un ejemplo es el trabajo de Zhang *et al.* (2006) quienes infectaron experimentalmente rotíferos *Brachionus urceus* (Linnaeus, 1758) con WSSV para posteriormente alimentar larvas de camarones *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765), que resultaron ser positivas para WSSV, a diferencia del control que fue negativo. La mortalidad acumulada en los estanques con infección (39,5 ± 15,4%), fue mayor que en los estanques control (34, 7 ± 15,1%), Aunque Zhang *et al*. (2006) reportaron que la mortalidad de los camarones infectados fue mayor que en el grupo control, esto no se vio reflejado en el análisis estadístico utilizando ANOVA (análisis de varianza), ya que no se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre tratamientos ($P > 0,05$). Esto suele ocurrir en este tipo de bioensayos, donde los datos no presentan una distribución normal. Así, el uso de modelos estadísticos que se adecúen a la distribución de los datos podría evitar confusiones en su interpretación. Sin embargo, los autores concluyeron que los rotíferos podrían servir como vector en la transmisión de WSSV. Por otro lado, Corteel *et al*. (2009), analizaron el impacto del proceso de muda y las lesiones en la cutícula de los camarones sobre la susceptibilidad a WSSV, mediante las vías de infección intramuscular o por inmersión. Para su análisis estadístico utilizaron pruebas no paramétricas, donde compararon la susceptibilidad a la infección entre etapas de muda a través de la prueba de Wilcoxon y las diferencias entre las fases de muda dentro de los grupos, mediante la prueba de Fisher, demostrando que los camarones analizados fueron más susceptibles a la infección vía inmersión con WWSV después de la

muda y que las heridas en la cutícula también pueden facilitar la infección.

El inconveniente de utilizar pruebas no paramétricas, es que éstas no son tan eficientes o claras como las paramétricas, ya que se puede enmascarar la información y llevar a una mayor probabilidad de no rechazar una hipótesis nula falsa (incurriendo en un error de tipo II). Entonces es necesario emplear modelos que se adapten a la propia distribución de los errores, siendo el Modelo Lineal Mixto, el más recurrido en estudios longitudinales (Bolker *et al*., 2009).

En este trabajo, los resultados de las pruebas estadísticas iniciales determinaron que los datos no presentaban una distribución normal y las varianzas no fueron homogéneas, tampoco cumplían con los supuestos de independencia y linealidad, lo que limitó la aplicación de un modelo clásico. Asimismo, se consideró que las transformaciones para normalizar los datos (log, raíz cuadrada, etc.), podrían eliminar el sesgo de la distribución y distorsionar el modelo. Por lo que se consideró conveniente usar un modelo lineal mixto, que se aplica para analizar los diseños de medidas repetidas en la misma unidad experimental en diferentes puntos en el tiempo y donde fue razonable asumir que existieran correlaciones entre observaciones del mismo ensayo. La modelación en el marco de los modelos lineales mixtos maneja estas correlaciones mediante la incorporación de variables aleatorias o mediante la modelación directa de la matriz de covarianza residual (McLean *et al*., 1991). Diversas estrategias, bajo el mismo marco teórico permiten modelar la variabilidad sobre y más allá del componente usual asociado a los términos del error (Zimmerman & Harville, 1991). En este caso permitió incrementar la precisión de las estimaciones de la infección con WSSV a partir de dos métodos de infección.

Los resultados de este estudio son alentadores ya que estadísticamente se pudo tener un mejor panorama sobre la evaluación de las dos vías de infección (inyección e inmersión). El modelo lineal mixto permitió determinar claramente las diferencias entre mortalidad y tiempo (días transcurridos) para ambos métodos de infección. Se puede decir entonces que hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las vías de infección. Por consiguiente, la inquietud acerca del cumplimiento de los supuestos tradicionales de normalidad y varianzas iguales deja de ser una incertidumbre al momento de evaluar diseños de "medidas repetidas" como lo mencionan (Fernández & Vallejo, 1996; Gómez, *et al*., 2012).

Finalmente, en este estudio se considera que la vía de infección por inmersión puede ser más conveniente y certera a la hora de evaluar infecciones experimentales, el efecto de inmunoestimulantes, probióticos y/o retrovirales contra enfermedades infecciosas tales como WSSV, mediante índices inmunológicos y fisiológicos.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece la beca de doctorado otorgada por CONACyT-México (CVU: 2172079). Este trabajo fue financiado por el proyecto Fomix-Yucatán-Conacyt (108373) y recursos propios del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular. Los autores agradecen los valiosos comentarios de los revisores que mejoraron el manuscrito.

REFERENCIAS

Bates, D., M. Maechler & N. Bolker. 2013. lme4: linear-mixed effects models using s4 classes. Retrieved from: http://CRAN.R-project.org/package=lme4 (R package version 0.999999-2). Revisado: 13 marzo 2014.

Bell, T.A. & D.V. Lightner. 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 114 pp.

Bolker, B.M., M.E. Brooks, C.J. Clark, S.W. Geange, J.R. Poulsen, M.H.H. Stevens & J.S.S. White. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. Trends Ecol. Evol., 24: 127-135.

Boyd, C.E. 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and allied aqua-cultures departmental series, Vol. 2. Alabama Agricul-tural Experiment Station, Auburn University, Auburn, 83 pp.

Chien, Y. 1992. Water quality requeriments and management for marine shrimp culture. Proceedings of the special session on shrimp farming. Baton Rouge, LA, pp. 144-156.

Corteel, M., J. Dantas-Lima, M. Wille, V. lday-Sanz, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2009. Molt stage and cuticle damage influence white spot syndrome virus immersion infection in penaeid shrimp. Vet. Microbiol., 137: 209-216.

Corteel, M., J. Dantas-Lima, J. Tuan, V.V. Thuong, K.V. Wille, M. Alday-Sanz, V. Maurice, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2012. Susceptibility of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* to different doses of high and low virulence strains of white spot syndrome virus (WSSV). Dis. Aquat. Org., 100: 211-218.

Dichmont, C.M. 2004. GLMs, GAMs and GLMMs: an overview of theory for applications in fisheries research. Fish. Res., 70: 319-337.

Douglas, B., M. Maechler, B. Bolker & S. Walker. 2013. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.0-5. http://lme4.r-forge.r-project.org. Revisado: 3 marzo 2014.

Fernández, P. & G. Vallejo. 1996. Diseño de medidas repetidas con dependencia serial en el error bajo la violación de la asunción de homogeneidad. An. Psicol., 12(1): 87-106.

Gitterle, T., B. Gjerde, J. Cock, M. Salazar, M. Rye, O. Vidal, C. Lozano, C. Erazo & R. Salte. 2006. Optimization of experimental infection protocols for the estimation of genetic parameters of resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*. Aquaculture, 261(2-24): 501-509.

Gómez, S., V. Torres, Y. García & J.A. Navarro. 2012. Procedimientos estadísticos más utilizados en el análisis de medidas repetidas en el tiempo en el sector agropecuario. Rev. Cub. Cienc. Agríc., 46(1): 1-7.

Huang, Y.C., Z.X. Yin, H.S. Ai, X.D. Huang, S.D. Li, S.P. Weng & J.G. He. 2011. Characterization of WSSV resistance in selected families of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 311: 54-60.

Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo & Y. Takahashi. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus,* after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture, 164: 277-288.

Jiravanichpaisal, P., K. Söderhäll & I. Söderhäll. 2006. Characterization of white spot syndrome virus replication in in vitro-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. J. Gen. Virol., 87: 847-854.

Kenward, M.G. & J.H. Roger. 1997. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. Biometrics, 53(3): 983-997.

Laird, N.M & J.H. Ware. 1982. Random-effects models for longitudinal data. Biometrics, pp. 963-974.

Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 305 pp.

Lotz, J.M., L.S. Anton & M.A. Soto. 2005. Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org., 65: 75-78.

McLean, R.A., W.L. Sanders & W.W. Stroup. 1991. A unified approach to mixed linear models. Am. Stat., 45: 54-64.

Prior, S., C.L. Browdy, E.F. Shepard, R. Laramore & P.G. Parnell. 2003. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. Dis. Aquat. Org., 54: 89-96.

Rahman, M.M., C.M. Escobedo-Bonilla, M. Corteel, J.J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday-Sanz, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 261: 842-849.

Rahman, M.M., M. Corteel, J.J. Dantas-Lima, M. Wille, V. Alday-Sanz, M.B. Pensaert, P. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2007. Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture, 269: 107-113.

Rahman, M.M., M. Corteel, C.M. Escobedo-Bonilla, M. Wille, V. Alday-Sanz, M.B. Pensaert, P.L. Sorgeloos & H.J. Nauwynck. 2008. Virulence of white spot syndrome virus (WSSV) isolates may be correlated with the degree of replication in gills of *Penaeus vannamei* juveniles. Dis. Aquat. Org., 79: 191-198.

R. Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing [Computer software manual]. Vienna, Austria. Retrieved from: http://www.R-project.org/ Revisado: 10 marzo 2014.

Sánchez-Martínez, J.G., G. Aguirre-Guzmán & H. Mejía-Ruiz. 2007. White spot syndrome virus in cultured shrimp: a review. Aquat. Res., 38: 1339-1354.

Soto, M.A. & J.M. Lotz. 2003. Transmission, virulence, and recovery coefficients of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) infections in Kona stock *Litopenaeus vannamei*. J. Aquat. Anim. Health., 15: 48-54.

Venables, W.N. & C.M. Dichmont. 2004. GLMs, GAMs and GLMMs: an overview of theory for applications in fisheries research. Fish. Res., 70: 319-337.

Vidal, O.M., C.B. Granja, L.F. Aranguren, J.A. Brock & M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. J. World Aquacult. Soc., 32: 364-372.

Wongmaneeprateep, S., N. Chuchird, P. Baoprasertkul, P. Prompamorn, K. Thongkao & C. Limsuwan. 2010. Effects of high water temperature on the elimination of white spot syndrome virus in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. KU. Fish. Res. Bull., 34: 14-26.

Zhang, J.S., S.L. Dong, X.L. Tian, Y.W. Dong, X.Y. Liu & D.C. Yan. 2006. Studies on the rotifer *Brachionus urceus* (Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. Aquaculture, 261: 1181-1185.

Zimmerman, D.L. & D.A. Harville. 1991. A random field approach to the analysis of field plot experiments and other spatial experiments. Biometrics, 47: 223-239.

Received: 31 March 2014; Accepted 8 April 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 566-574, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-18

Research Article

Digestible energy requirement for females of *Rhamdia quelen* on reproductive activity fed with ration based on vegetal ingredients

Robie A. Bombardelli[1], Eduardo A. Sanches[2], Lucélia Tessaro[3], Alexandre H. Buzzi[4] Cleide V.B. Martins[5] & Fábio Meurer[6]
[1]Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua da Faculdade 645, Jardim Santa Maria
CEP 85903-000, Toledo, Paraná, Brasil
[2]Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Avenida Nelson Brihi Badur 430, Vila Tupy, CEP 11900-000, Registro, São Paulo, Brasil
[3]Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Rua 25 de Julho 565, CEP 85470-000, Catanduvas, Paraná, Brasil
[4]Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua da Faculdade 645, Jardim Santa Maria
CEP 85903-000, Toledo, Paraná, Brasil
[5]Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua da Faculdade 645, Jardim Santa Maria
CEP 85903-000, Toledo, Paraná, Brasil
[6]Universidade Federal do Paraná. Rua Dr. Maximiano 426, Centro, CEP 86900-000
Jandaia do Sul, Paraná, Brasil
Corresponding author: Robie A. Bombardelli (rabombardelli@gmail.com)

ABSTRACT. The present experiment was carried out to evaluate the growth and reproductive parameters of *Rhamdia quelen* females fed with pelleted ration containing different levels of digestible energy, and to evaluate the vigor of their offspring. The breeders were placed in tanks under conditions of photoperiod and natural temperature. The fishes were fed for 255 days with isoproteic rations pelleted containing 35% of crude protein (CP) and five levels of the digestible energy (DE) (2700, 2950, 3200, 3450, 3700 kcal kg^{-1}). The fishes were distributed in a randomized experimental design compounded by five treatments and three repetitions. A 16-m^2 tank containing six females and three males was considered as one experimental unit. The weight and weight gain was evaluated. During the reproductive season the females were induced to breeding by hormonal manipulation and were evaluated the percentage of spawning females, the total fecundity, relative fecundity (number of oocytes per gram of spawning females), the fertilization ratio, the time to hatching and the vigor of larvae. The growth and reproductive parameters were not influenced ($P > 0.05$) by the increasing levels of digestible energy of the rations. The feeding of *R. quelen* females in breeding fit can be carried out with 2700 kcal kg^{-1} pelletized ration based on vegetal ingredients, without damage to reproductive performance.

Keywords: *Rhamdia quelen*, eggs, fertilization, larvae, nutrition, reproduction, aquaculture.

Requerimientos de energía para la reproducción de hembras de *Rhamdia quelen* alimentadas con dietas a base de ingredientes vegetales

RESUMEN. El presente estudio se efectuó para evaluar el crecimiento y reproducción de hembras de bagre (*Rhamdia quelen*) alimentadas con dietas con diferente contenido de energía, elaboradas con ingredientes vegetales. Además, se evaluó el vigor de las crías. Los reproductores se colocaron en estanques en condiciones de fotoperiodo y temperatura ambiente. Los peces fueron alimentados durante 255 días con raciones isoproteicas que contenían 35% de proteína cruda (PC) y 2700, 2950, 3200, 3450 y 3700 kcal de energía digestible (ED) kg^{-1}. Los peces se distribuyeron en un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y tres repeticiones. Para el experimento se emplearon estanques de ~16 m^2 con seis hembras y tres machos. Se evaluó el peso medio final y la ganancia media de peso. Durante el período reproductivo se evaluó el porcentaje de hembras que desovan, número total de ovocitos, número de ovocitos por gramo en hembras reproductoras, tasa de fertilización, tiempo

Corresponding editor: Jesús T. Ponce

necesario para que la eclosión de los huevos y tiempo de supervivencia de las larvas. El crecimiento y los parámetros reproductivos no fueron afectados (P > 0,05) por el aumento de los niveles de energía de las raciones. Se concluye que para obtener mejor reproducción de bagre (*R. quelen*) se recomienda emplear raciones peletizadas de 2700 kcal kg^{-1}.

Palabras clave: *Rhamdia quelen*, huevos, fertilización, larvas, nutrición, reproducción, acuicultura.

INTRODUCTION

The nutrition has always shown its value to the aquaculture, in view of its influence on growth and on the quality of the meat (Santos & Oba, 2009). However, in the last years, a lot of attention has been given to the effects of fish diets on breeding (Coldebella *et al*., 2011) and about the quantitative and qualitative production of the offspring (Parra *et al*., 2010).

Attention is given to the knowledge of the direct or indirect influence of nutrition on the reproductive performance of fresh water fishes (Izquierdo *et al*., 2001), due the expressive growth of the Latin America aquaculture in recent years (FAO, 2012). In this set, where fishes constitute the main group reared and their production have been increased 97% between 2003 and 2009 in some countries (Lopera-Barrero *et al*., 2011), it is verified the imminent necessity of guarantee the production of offspring in quantity and quality to attend the productive demand (Bombardelli *et al*., 2009).

Some researches on nutrition of fish breeder have been carried out with different species and suggest that the breeder nutrition promotes influences on reproductive performance of the females (Ng & Wang, 2011) or males (Bombardelli *et al*., 2010) and influence the offspring quality (Sink & Lochmann, 2008; Sink *et al*., 2010). In addition, the diet composition can influence the reproductive physiology (Navas *et al*., 1998), limiting the juveniles production in quantity and quality (Izquierdo *et al*., 2001).

In females of several species the diet influence the size, the composition and the color of oocytes (Tyler & Sumpter, 1996; Wiegand, 1996). A few authors relate the effect of the diet on the fertilization ratio in "black sea bass" (*Centropristis striata*) (Bentley *et al*., 2009), on the vigor and the survival of the Nile tilapia offspring (*Oreochomis niloticus*) (Bombardelli *et al*., 2009) and on the growth of the *Rhamdia quelen* larvae (Parra *et al*., 2008, 2010). However, the relationship between the breeding and nutrition of fishes is not clear (Bobe & Labbé, 2010) and dealing with Neotropical species, the quantity of available information is reduced or almost absent.

The efforts to develop the technological package to *R. quelen* are due to its wide distribution in Central America and South America (Gomes *et al*., 2000), and its importance for commercial aquaculture (Baldisserotto, 2009). These actions are corroborated by the technological limitations used in the production systems of Neotropical fishes, as the silver catfish, that difficult the enhancement of production. In these bounds, the lack of technologies focused to the production of juveniles (Andrade & Yasui, 2003) and the absence of appropriate nutritional and reproductive management may be pointed as responsible for this scenario.

In this sense, this research was carried out to feed *R. quelen* females with pelletized rations containing different levels of digestible energy and formulated with food of vegetal origin to evaluate the female growth parameters, the female reproductive performance and to evaluate the vigor of their offspring.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in the Laboratory of Reproductive Technology for Farmed Aquatic Animal (LATRAAC), at the Institute for Research in Environmental Aquaculture (InPAA), Western Parana State University (UNIOESTE).

During 255 days, 90 silver catfish females (*R. quelen*) (44.67 ± 0.60 g) and 45 males (44.22 ± 1.17 g) were allocated in excavated tanks covered by brickwork with total area of 16 m^2 and fed with experimental rations containing different levels of digestible energy. The fishes were distributed in a randomized experimental design, compound by five treatments and three repetitions, totalizing 15 experimental units. Treatments were constituted by the individuals feeding with diets containing 35% of crude protein (CP) and 2700, 2950, 3200, 3450 and 3700 kcal digestible energy (DE) kg of ration^{-1} (Table 1). It a 16 m^2 tank, containing six females and three males, was considered as one experimental unit.

Previously, the formulation of rations ingredients were evaluated by their nutritional composition. The value of protein and digestible energy were calculated according to Oliveira-Filho & Fracalossi (2006). For the manufacture of the rations, the ingredients were crushed in a hammer mill, sieved in a mesh of 0.5 mm, and submitted to a pelletization process in a pattern of 3 mm of diameter (Bombardelli *et al*., 2010).

Table 1. Ingredients and feed formulation (wet basis) of experimental rations containing different levels of provided to the breeders of the silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Composition of product milligram per kilogram (Folic acid - 200 mg, pantothenic acid - 4,000 mg, biotin - 40 mg, copper - 2,000 mg, iron - 12,500 mg, iodine - 200 mg; manganese - 7,500 mg; niacin - 5,000 mg, selenium - 70 mg, vitamin A - 1,000,000 UI, vitamin B1 - 1,900 mg, vitamin B12 - 3,500 mg, vitamin B2 - 2,000 mg. vitamin B6, 2,400 mg; vitamin C - 50,000 mg, vitamin D3 - 500,000 UI, vitamin E - 20,000 UI, vitamin K3 - 500 mg, zinc - 25,000 mg).

Ingredient (g kg^{-1})	Digestible energy (kcal kg^{-1})				
	2700	2950	3200	3450	3700
Soybean bran	629.5	630.9	632.2	633.6	638.7
Corn for grain	226.4	226.4	226.3	226.3	197
Corncobs	97.7	68.8	40	11.2	0
Bicalcic phosphate	23	23	23	23.1	23.3
Limestone	5.3	5.3	5.4	5.5	5.3
Vitamin and mineral supplement*	10	10	10	10	10
DL – methionine	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
Salt	5	5	5	5	5
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Soybean oil	0	27.3	54.7	82.1	117.5
Nutrients and proximate composition (% dry matter)					
Starch	15.99	16.00	16.00	16.00	16.00
Calcium	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ash	8.10	7.94	7.79	7.63	7.58
ED silver catfish (kcal kg^{-1})	2700.00	2950.00	3200.00	3450.00	3700.00
Crude fiber	6.41	5.49	4.57	3.65	3.26
Total phosphorus	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Fat	1.19	3.89	6.58	9.28	12.71
Isoleucine	1.44	1.44	1.44	1.45	1.45
Leucine	2.51	2.51	2.52	2.52	2.51
Mineral matter	4.11	4.12	4.13	4.14	4.13
Dry matter	88.73	88.97	89.21	89.45	89.85
Total Met+Cystine	1.25	1.25	1.26	1.26	1.25
Total methionine	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
Digestible protein	30.45	30.51	30.58	30.64	30.68
Crude protein	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00

The fishes were fed twice a day, in a predetermined schedule (10:00 and 15:00 h). Fortnightly, all fishes were separated by sex and weighted to correct the feeding rates. At the end of the experimental period the body weight of the females were individually measured (Marte AS2000C ± 0.01 g). From these data, the parameters of corporal weight and weight gain were calculated (Tessaro *et al*., 2012).

The water supply, where the fishes were confined, was maintained only to compensate the evaporated and infiltrated water. The water temperature was measured daily with a thermometer of maximum and minimum, with accuracy of ±0.1°C. Fortnightly, the pH of the water was measured (Tecnal® Tec 5) and the water dissolved oxygen (YSI 550A), both at 10:00 and 16:00 h (Reidel *et al*., 2010).

During the reproductive period, all females of each experimental unity were submitted into the protocol of artificial breeding to the evaluation of the reproductive parameters. The female were individually weighted and allocated in tanks endowed of aeration and recirculation of water, under controlled temperature (24 ± 1.0ºC) by electric heating. The hormonal induction for the synchronization of ovulation was conducted by the protocol employing carp pituitary extract (CPE) (Woynarovich & Horváth, 1983) applied intramus-cularly in the dorsal region. The hormonal dosage used was of 5.5 mg CPE per kg of female, distributed in two applications, being 10% in the first applications and the rest 12 h after the first one (adapted from Tessaro *et al*., 2012). The oocytes gathering of each female were realized by an abdominal massage, after 240 hour-

degree (10 h; water at 24ºC) counted from the second hormonal application (Bombardelli *et al.*, 2006).

The semen used on the artificial fertilization procedures were from another males that were not submitted to the experimental diets. The procedure of hormonal induction of the males and the gathering of the semen were similar to the females, but they received only one dose of 2.5 mg CPE per kg of male (Bombardelli *et al*., 2006).

The weight of oocytes bulk released by each female was measured (Marte AY220; ± 0.0001 g), hereupon, three samples of approximately 0.1 g of oocytes were separated and weighted to quantify the number of present oocytes in one gram of released oocytes. Finally, were calculated and evaluated the percentage of spawning females (percentage of females that released oocytes after the hormonal induction and the abdominal massage), the absolute fecundity (total number of oocytes released per female) and the relative fecundity (number of oocytes released by each female in relation of body weight).

All of oocytes from each spawning female, from each experimental unity, were mixed originating a "pool" of oocytes. Hereupon, for the fertilization essay, 2.0 g of oocytes from each "pool" were fertilized (Sanches *et al*., 2011) with 0.1 mL of semen ($1.74 \times 10^{10} \pm 0.32 \times 10^{10}$ spermatozoa mL^{-1}; 97.65 ± 1.53% of alive spermatozoa; 25.44 ± 3.34 s to loss of 50% of sperm motility). The amount of 10 mL of water was used to accomplish the fertilization of the oocytes (adapted from Witeck *et al.,* 2011). The water used in the incubation of the eggs was originated from an artesian well of the research station and presented the values: pH = 6.96 (digital pH m Tecnal® Tec 5), dissolved oxygen = 4.01 mg L^{-1} (digital oximeter YSI® 550A); alkalinity = 945.10 μEq L^{-1} (Carmouze, 1994); hardness = 53.23 mg L^{-1}; ammonia = 0.134 mg L^{-1} (Korollef, 1976); nitrite = 0.0045 mg L^{-1} (Strickland & Parsons, 1972); nitrate = 0.31 mg L^{-1} (Mackereth *et al.*, 1978).

After the fertilization, the eggs were distributed in 15 experimental hatchery made in PVC, cone-shaped and volume of 2.5 L. The water used in the hatchery was kept warm at 24 ± 1.0ºC by electrical heat.

After the closing of the blastopore (eight hours after the fertilization) (Amorim *et al.,* 2009), the percentage of the artificial fertilization were gauged. These were estimated by the count of three samples of 300 eggs of each experimental unity (Sanches *et al.,* 2011). The necessary time to occur the hatching of eggs from each experimental unity was measured by the evaluation of thermal unities accumulated (Woynarovich & Horváth, 1983).

After the hatching of the eggs, were used 1500 post-larvae with three days age, to evaluate the effects of rations provided to the breeders on the post-larvae vigor (Bombardelli *et al.,* 2009). The post-larvae were distributed in 15 aquariums of 50 L, where each aquarium contained 100 post-larvae of *R. quelen*. To the mensuration of this parameter was considered the necessary time to occur the mortality of 100% of the fishes present in the aquarium and submitted to the fasting (adapted from Lavens *et al.*, 1999).

Data of the growth and reproductive parameters of *R. quelen* females and the vigor parameters of their offspring were submitted to analysis of variance at 5% level of significance. In case of evidence of effects of treatments would be applied analysis of regression. The assumptions of normality and homoscedasticity were checked and, when necessary data transformations were accomplished as suggested by Quinn & Keough (2002). The used software was the Statistica 7.0© (StatSoft, 2007).

RESULTS

The physical and chemical parameters of the water did not presented differences ($P > 0.05$) among the treatments. The water temperature varied from 18.75 ± 2.87°C (winter and beginning of spring) to 24.14 ± 2.53°C (spring and summer) and presented 20.99 ± 3.91°C as medium value during the experimental period. The electrical conductivity of the water was 42.29 ± 17.19 µS cm^{-1}. The averages of pH and of dissolved oxygen were 7.34 ± 1.00 and 5.67 ± 1.75 mg L^{-1}, respectively.

The different levels of digestible energy of ration did not influence ($P > 0.05$) the growth of fishes during the experimental period (Table 2). The female presented middle-weight between 118.24 and 148.47 g, representing weight gains between 73.58 and 103.58 g, during the experimental period (Table 2).

The percentage of spawning females was above 63.33% and was not influenced ($P > 0.05$) by the rations (Table 2). The same way, the reproductive parameters related with the fecundity and the fertility did not suffer the effects ($P > 0.05$) of levels of digestible energy in rations (Table 2). In general, the females produced between 177 and 269 oocytes per gram of spawning female, with taxes of artificial fertilization between 72.2 and 88.4% (Table 2) and time to hatching above 499.04 hours-degree (20 h 47 min 36 s; water at 24ºC). Finally, the vigor of the offspring measured by the time of survival of the larvae to the fasting also was not influenced ($P > 0.05$) by the

Table 2. Growth and reproductive index of *Rhamdia quelen* females fed with ration containing different levels of digestible energy and parameters of offspring quality. BW: final body weight, WG: weight gain, SF: spawning female, O.SF^{-1}: oocyte.spawning female^{-1}, O.GSF^{-1}: oocyte.g of spawning female^{-1}, FR: fertilization ratio, HD: hour-degree to hatching and TSF: time of survival of the larvae to the fasting. * *P* = *P*-value.

Parameters	Digestible energy (kcal kg^{-1} of ration)					*P**
	2700	2950	3200	3450	3700	
BW (g)	118.24 ± 2.84	131.07 ± 29.18	132.10 ± 8.34	131.64 ± 31.05	148.47 ± 3.83	0.50
WG (g)	73.58 ± 2.84	86.40 ± 28.86	87.66 ± 7.70	86.97 ± 30.41	103.58 ± 2.66	0.49
SF (%)	8.89 ± 19.25	78.33 ± 20.21	63.33 ± 21.86	88.89 ± 19.25	83.33 ± 28.87	0.62
O.SF^{-1} (x10^3)	17.86 ± 5.88	18.34 ± 2.61	12.93 ± 7.52	21.64 ± 11.50	22.56 ± 20.14	0.52
O.GSF^{-1}	225.00 ± 27.00	269.00 ± 99.00	177.00 ± 75.00	242.00 ± 44.00	254.00 ± 118.00	0.41
FR (%)	85.15 ± 4.35	88.39 ± 6.45	72.24 ± 8.02	73.17 ± 22.54	84.61 ± 10.29	0.40
HD (h°C)	545.00 ± 65.89	517.39 ± 23.79	499.04 ± 63.72	527.47 ± 43.04	522.83 ± 44.44	0.86
TSF (days)	6.99 ± 0.77	7.43 ± 1.22	7.22 ± 1.06	7.24 ± 0.60	7.10 ± 0.52	0.98

rations provided to the females of silver catfish (Table 2).

DISCUSSION

Information about the environmental requirements to guarantee the suitable development of silver catfish suggests that the physical and chemical variables of the water remained into the bounds recommended to the suitable development of the specie (Baldisserotto & Radünz-Neto, 2004). However, there is no factual information about the environmental demand of females to the reproductive phase.

In spite of tested rations showing great variation between the highest and the lowest energetic level (1000 kcal kg^{-1}) and expected changes in the growth rate, the results of these variables did not suffer the effects of rations. Recent researches verified similar results, confirming the present work. Parra *et al.* (2008) studying the different effects lipid sources in rations to females of silver catfish (*R. quelen*) in reproductive activity also did not verify the effects of the rations over the growth. The absence of this effect also was verified by Reidel *et al.* (2010), when extruded rations were tested containing different levels of protein and energy in female of silver catfish raised in net cages. Coldebella *et al.* (2011) also did not verify the effect of pelleted rations containing different levels of crude protein (28, 34 and 40%) over the growth of females of this specie in reproductive activity.

The levels of digestible energy of rations also did not influence the reproductive parameter. Solid information about the percentage of spawning females of silver catfish (*R. quelen*) is scarce in the literature. Recently, Tessaro *et al.* (2012) verified that 76 to 89% of females of silver catfish, fed with pelleted rations containing different levels of energy presented release of oocytes after the hormonal induction. However, these authors did not verified effects of rations over the percentage of spawning females. The same was reported by Bombardelli *et al.* (2009) on female of Nile tilapia (*Oreochomis niloticus*) fed with rations made with foods of vegetal origin and containing between 2700 and 3700 kcal kg^{-1}.

The fecundity is one of the most important parameter to be considered in the reproduction of captivity fishes (Godinho, 2007) because it represents the animal reproductive condition and subsidizes the production planning. Levels of energy influenced none of the parameters linked with the fecundity of females of silver catfish, evaluated in the present experiment. This was also verified by Coldebella *et al.* (2011) when females silver catfish (*R. quelen*) were fed with pelleted rations containing 28, 34 and 40% of crude protein.

The fecundity may present variations in results due to factors as: age of breeder, the season of gametes gathering and, the procedures used for hormonal handling and the oocytes gathering. Considering that females used in this research presented age correspondent to the first maturation, the values of relative fecundity suggest values within the pattern of the species or slightly higher. Generally, the captivity females produce between 116 (Bombardelli *et al.*, 2006) to 177 ± 15 oocytes.g of female^{-1} (Sanches *et al.*, 2011) or wild females until 254 oocytes.g of female^{-1} (Gomieiro *et al*., 2007).

The fertilization is also an important event in the artificial breeding of fishes, because it defines the meeting of male and female gametes and the fusion of its pro-nuclei and the beginning the embryonic development (Murata, 2009). Despite its importance, the results of the present experiment suggest that the levels of digestible energy of the rations do not interfere over the de taxes of artificial fertilization of the oocytes

of *R. quelen*. Parra *et al.* (2010) feeding the females of silver catfish with different protein sources also did not evidenced the effect of rations over the taxes of fertilization, but have documented mean values between 81.3 and 82.1%. Coldebella *et al.* (2011) also tested rations containing different levels of gross protein and verified similar effect, with taxes of 82.42 ± 7.97% or 92.37 ± 1.58%.

The necessary time to occur the outbreak of the eggs also deserves highlight, because it is directly related to the conditions that promote embryonic development. This variable defines the moment when occur the rupture of the chorion (Nwosu & Holzlöhner, 2000), caused by muscle contractions of the tail and of the body of the embryo, initiating the larval development (Amorim *et al.*, 2009). Although this parameter did not suffer influence of the feed, the time period measured in thermal accumulated unities to occur hatching were below the standards suggested for the species, corresponding to between 600 (Amorim *et al.*, 2009) and 720 h°C (Pereira *et al.*, 2006). Despite its importance, the information about the thermal unities accumulated (h°C) to occur the hatching of *R. quelen* were scarce and, especially as regards their relationship with the nourishment of reproducers, these information are unavailable in the literature.

The fact of the levels of energy of rations did not influenced the vigor of the offspring suggests that treatments did not affected on the reproductive physiology of females, especially on the process of vitellogenesis. The relation between the offspring vigor and the vitellogenesis is established by hepatic and extrahepatic metabolism to the mobilization of nutrients and constitution of vitellogenin (Mommsen & Korsgaard, 2008), who is incorporated into oocyte to constitute the yolk (Coward *et al.*, 2002). The yolk is considered as the main deposit or source of nutrients and energy to the initial embryonic development. This way, your quantity or quality will reflect directly on the vigor of the offspring (Bombardelli *et al.*, 2009). Despite the difficulty in accomplishing a comparison with the present research, the results of Coldebella *et al.* (2011) evaluating the dietetic protein for female of silver catfish (*R. quelen*), suggest the lack of diet effect on reproductive physiology of female, since was also not verified the effects of rations on the reproduction, either on metabolic parameters related to the reproduction process.

Despite of the results of growth and of the reproductive parameters induce the idea that the silver catfish tolerates a wide range of variation of the energetic content of rations, attention must be given to possible long-term effects, and to those that still require clarification. As an example, recent researches suggest that the dietetic energy promotes cellular alterations as vacuolization and hepatocyte hypertrophy (Tessaro *et al.*, 2012), which may interfere on the reproductive health of the animal in the medium or long term. Besides, this process of vacuolization may be potentiated and promote hepatic steatosis, as verified in "Gilthead seabream" (*Sparus aurata*), when the animals are fed with diets rich in soybean oil, due to the imbalance of fatty acids in the diet (Caballero *et al.*, 2004).

Although Tessaro *et al.* (2012) have used diets with protein foods of animal origin and present similar results with this experiment, other potentially influential factor in the results of this research is related to the fact of rations have been made with only food of plant origin. This way, especially the increase in the proportion of soybean meal in diets for Nile tilapia females reduced the levels of 17β-estradiol plasma and delayed the ovarian development from the 20th weeks of treatment (Fontaínhas-Fernandes *et al*., 2000).

Many studies have shown estrogenic effects of foods of vegetable origin in humans, rodents and fishes. These effects are due to the fact that the endocrine systems of vertebrates are susceptible to deregulation by environmental chemicals, industrial products and components or derivatives of natural origin (Schiller *et al.*, 2013). Furthermore, the use of the experimental diets may have led to decreased metabolism related to reproductive activity through the negative effect of soy on reproduction, as observed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Bennetau-Pelissero *et al.* (2001). These authors have tested three different diets and found that levels of 0.5 g of genistein kg feed^{-1} (phytoestrogen present in soy) for females, promoted the deficiency in the development of the gonads and the decrease in plasma levels of gonadotropins (LH) and 17α, 20β(OH)$_2$ progesterone during the peak of vitellogenesis. Furthermore, El-Sayed *et al.* (2012) to test the effects of phytoestrogens on sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), observed that with the increase of genistein, there was inhibition of aromatase, the enzyme responsible for the production of 17β-estradiol. Similarly, high doses of genistein also inhibited estradiol metabolism in the liver and kidney of salmonids (Ng *et al.*, 2006).

In general, the influence of nutrition on the reproductive process of fish is poorly understood (Bobe & Labbé, 2010) and the results of recent research are often contradictory and difficult to compare. The research related to nutrition of breeder of silver catfish suggest that nutrition does not exert significant influence on reproduction, at least in regard to requirements for protein, energy and fat sources (Tessaro *et al.*, 2012). Yet, speculations can be made

for some species under the influence of different diet fatty acid profiles on reproduction (Bell *et al.*, 1997; Berntsson *et al.*, 1997; Asturiano *et al.*, 2001), and not only by the level of dietary energy generated by adding foods that define a unique fatty acid profile. Also, food consumption is also important for breeding of fishes (Estévez, 2009) and should be measured, because these animals may regulate consumption depending on the level of nutrients present in the diets (Pezzato *et al.*, 2004).

In general, due to the limited amount of information available about this subject, it is premature to assert that nutrition does not affect the breeders and therefore, it is suggested that new researches be conducted to elucidate the relationships between nutrition and reproduction of silver catfish (*R. quelen*).

Finally, silver catfish females in reproductive activity can be fed with pelleted rations, manufactured based on soybean meal, soybean oil and corn, containing 2,700 ED kg feed^{-1}, without growth or reproductive performance damage.

REFERENCES

Amorim, M.P., B.V.C. Gomes, Y.S. Martins, Y. Sato, E. Rizzo & N. Bazzoli. 2009. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. Aquacult. Res., 40: 172-180.

Andrade, D.R. & G.S. Yasui. 2003. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. Rev. Bras. Reprod. Anim., 27: 166-172.

Asturiano, J.F., L.A. Sorbera, M. Carrillo, S. Zanuy, J. Ramos, J.C. Navarro & N. Bromage. 2001. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. Aquaculture, 194: 173-190.

Baldisserotto, B. 2009. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. Cienc. Rural, 39: 291-299.

Baldisserotto, B. & J. Radünz Neto. 2004. Criação de jundiá. Editora UFSM, Santa Maria, 232 pp.

Bell, J.G., B.M. Farndale, M.P. Bruce, J.M. Navas & M. Carillo. 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 149: 107-119.

Bennetau-Pelissero, C.B., B. Breton, G. Bennetau, F. Corraze, B. Le Mann, C. Devail-Cuisset, C. Helou & S. Kaushik. 2001. Effect of Genistein-Enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocr., 121: 173-187.

Bentley, C.D., W.O. Watanabe, T.C. Rezek & P.J. Seaton. 2009. Preliminary investigations on the effects of dietary lipid on the spawning performance and egg quality of black sea bass *Centropristis striata* L. Aquacult. Res., 40: 1873-1883.

Berntsson, K.M., P.R. Jonsson, S.A. Wängberg & A.S. Carlsson. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. Aquaculture, 154: 139-153.

Bobe, J. & C. Labbé. 2010. Egg and sperm quality in fish. Gen. Comp. Endocr., 165: 535-548.

Bombardelli, R.A., C. Hayashi, M.R.M. Natali, E.A. Sanches & P.A. Piana. 2010. Níveis de energia digestível sobre os desempenhos reprodutivo e zootécnico e a deposição de lipídios nos hepatócitos de machos de tilápia-do-nilo. Rev. Bras. Zootec., 39: 941-949.

Bombardelli, R.A., C. Hayashi, M.R.M. Natali, E.A. Sanches & P.A. Piana. 2009. Desempenho reprodutivo e zootécnico e deposição de lipídios nos hepatócitos de fêmeas de tilápia-do-nilo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. Rev. Bras. Zootec., 38: 1391-1399.

Bombardelli, R.A., E.F. Mörschbächer, R. Campagnolo, E.A. Sanches & M.A. Syperreck, M.A. 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). Rev. Bras. Zootec., 35: 1251-1257.

Caballero, M.J., M.S. Izquierdo, E. Kjørsvik, A.J. Fernández & G. Rosenlund. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. J. Fish. Dis., 27: 531-541.

Carmouze, J.P. 1994. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos. Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. Fapesp, São Paulo, 253 pp.

Coldebella, I.J., J. Radünz-Neto, C.A. Mallmann, C.A. Veiverberg, G.T. Bergamin, F.A. Pedron, D. Ferreira & L.J.G. Barcellos. 2011. The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. Aquaculture, 312: 137-144.

Coward, K., N.R. Bromage, O. Hibbitt & J. Parrington. 2002. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Rev. Fish Biol. Fisher., 12: 33-58.

El-Sayed, A.F., E.H. Abdel-Aziz & H.M. Abdel-Ghani. 2012. Effects of phytoestrogens on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets treated with 17α-Methyltestosterone. Aquaculture, 360-361: 58-63.

Estévez, M.A.C. 2009. La reproducción de los peces: aspectos básicos e sus aplicaciones em acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, 718 pp.

Fontaínhas-Fernandes, A., M. Monteiro, A. Figueiredo, E. Gomes, J. Coimbra & M.A. Reis-Henriques. 2000. Partial or total replacement of fish meal by plant protein affects gonadal development and plasma 17 β-estradiol levels in female Nile tilapia. Aquacult. Int., 8: 299-313.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012. The state of world fisheries and aquaculture. FAO, Roma, 230 pp.

Godinho, H.P. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Rev. Bras. Reprod. Anim., 31: 351-360.

Gomes, L.C., J.I. Golombieski, A.R. Gomes & B. Baldisserotto. 2000. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). Cienc. Rural, 30: 179-185.

Gomieiro, L.M., U.P. Souza & F.M.S. Braga. 2007. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. Biota Neotrop., 7: 127-133.

Izquierdo, M.S., H. Fernández-Palacios & A.G.J. Tacon. 2001. Effect of broodstock nutrition reproductive performance of fish. Aquaculture, 197: 25-42.

Korollef, F. 1976. Determination of nutrients. In: K. Grasshoff & T. Almgreen (eds.). Methods of seawater analysis. Verlag Chemie, Weinhein, pp. 264-312.

Lavens, P., E. Lebegue, H. Jaunet, A. Brunel, P.H. Dhert & P. Sorgeloos. 1999. Effects of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. Aquacult. Int., 7: 225-240.

Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, J.A. Povh, L.D.V. Mendez & A.R. Poveda-Para. 2011. Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo. Agrolivros, Guaíba, 317 pp.

Mackereth, F.J.H., J. Heron & J.F. Talling. 1978. Water analysis: some methods for limnologists. Freshwater Biological Association, London, 120 pp.

Mommsen, T.P. & B. Korsgaard. 2008. Vitellogenesis. In: M.J. Rocha, A. Arukwe & B.G. Kapoor (eds.). Fish reproduction. Science Publishers, New Hampshire, pp.113-170.

Murata, K. 2009. Fertilization. In: B.G.M. Jamieson (ed.). Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes). Science Publichers, New Hamshire, pp. 247-330.

Navas, J.M., E. Manãnos, M. Thrush, J. Ramos, S. Zanuy, M. Carrillo, Y. Zohar & N. Bromage. 1998. Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17β-estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture, 165: 65-79.

Ng, W. & Y. Wang. 2011. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to brood fish fed diets with added fish oil or linseed oil. Aquaculture, 314: 122-131.

Ng, Y., S. Hanson, J.A. Malison, B. Wentworth & T.P. Barry. 2006. Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. Aquaculture, 254: 658-665.

Nwosu, F.M. & S. Holzlöhner. 2000. Influence of temperature on egg hatching, growth and survival of larvae of *Heterobranchus longifilis* Val. 1840 (Teleostei: Clariidae). J. Appl. Ichthyol., 16: 20-23.

Oliveira-Filho, P.R.C. & D.M. Fracalossi. 2006. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. Rev. Bras. Zootec., 35: 1581-1587.

Parra, J.E.G., J. Radünz-Neto, C.A. Veiverberg, R. Lazzari, G.T. Bergamin, F.A. Pedron, S. Rossato & F.J. Sutili. 2008. Alimentação de fêmeas de jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. Cienc. Rural, 138: 2011-2017.

Parra, J.E.G., J. Radünz-Neto, C.A. Veiverberg, R. Lazzari, G.T. Bergamin, V. Corrêia, C.C. Ferreira & F.W. Ferreira. 2010. Desempenho reprodutivo de fêmeas de jundiá alimentadas com diferentes fontes protéicas. Arch. Zootec., 59: 255-265.

Pereira, C.R., L.J.G. Barcellos, L.C. Kreutz, R.M. Quevedo, F. Ritter & L.B. Silva. 2006. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American catfish. Braz. J. Biol., 66: 1057-1063.

Pezzato, L.E., M.M. Barros, D.M. Fracalossi & J.E.P. Cyrino. 2004. Nutrição de peixes. In: J.E. Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi & N. Castagnolli (eds.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. TecArt, São Paulo, pp.75-170.

Quinn, G.P. & J.M. Keough. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, New York, 537 pp.

Reidel, A., W.R. Boscolo, A. Feiden & E. Romagosa. 2010. The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation

of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. Aquaculture, 298: 354-359.

Sanches, E.A., G. Neumann, D.M. Baggio, R.A. Bombardelli, P.A. Piana & E. Romagosa. 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. Aquaculture, 319: 453-458.

Santos, L.R.B. & E.T. Oba. 2009. Dieta: ferramenta importante para manejo dos peixes no cultivo. In: M. Tavares-Dias (ed.). Manejo e sanidade de peixes de cultivo. Embrapa, Amapá, pp. 89-105.

Schiller, V., A. Wichmann, R. Kriehuber, E. Muth-Köhne, J.P. Giesy, M. Hecker & M. Fenske. 2013. Studying the effects of genistein on gene expression of fish embryos as an alternative testing approach for endocrine disruption. Comp. Biochem. Phys. C., 157: 41-53.

Sink, T.D. & R.T. Lochmann. 2008. Effects of dietary lipid source and concentration on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg biochemical composition, egg and fry production, and egg and fry quality. Aquaculture, 283: 68-76.

Sink, T.D., R.T. Lochmann, C. Pohlenz, A. Buentello & D. Gatlin III. 2010. Effects of dietary protein source and protein-lipid source interaction on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg biochemical composition, egg production and quality, and fry hatching percentage and performance. Aquaculture, 298: 251-259.

Received: 18 August 2014; Accepted: 8 April 2015

Statsoft Inc. 2007. Statistic (data analysis software system). Version 7.1. Tulsa.

Strickland, J.D.H. & T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Bd. Can., Ottawa, 310 pp.

Tessaro, L., C.P.R. Toledo, G. Neumann, R.A. Krause, F. Meurer, M.R.M. Natali & R.A. Bombardelli. 2012. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. Aquaculture, 326-329: 74-80.

Tyler, C.R. & J.P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish Biol. Fisher., 6: 287-318.

Wiegand, M.D. 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. Rev. Fish Biol. Fisher., 6: 259-286.

Witeck, L., R.A. Bombardelli, E.A. Sanches, J.D. Silva, D.M. Baggio & B.E. Souza. 2011. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. Rev. Bras. Zootec., 40: 477-481.

Woynarovich, E. & L. Horváth. 1983. Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Escopo, Brasilia, 224 pp.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 575-580, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-19

Short Communication

La comunidad de Mata de Limón, Pacífico central de Costa Rica y la extracción de colonchos *Callichirus seilacheri* (Bott, 1955) (Decapoda: Axiidea: Callianassidae)

Patricio Hernáez[1,2,4] & Hernán Granda-Rodríguez[3,4]
[1]Centro de Estudios Marinos y Limnológicos, Departamento de Biología
Facultad de Ciencias Universidad de Tarapacá, Av. General Velásquez 1775, Arica, Chile
[2]Programa de postgrado, Departamento de Biologia (FFCLRP), Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900
14040-901, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil
[3]Consultores ambientales y salud ambiental, Santa Marta, Colombia
[4]Programa de postgrado en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza
Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile
Corresponding author: Patricio Hernáez (phernaez@lycos.com)

RESUMEN. En el presente estudio, se realizaron visitas mensuales a la comunidad de Mata de Limón (diciembre 2011 a noviembre 2012) localizada en el Pacífico central de Costa Rica para evaluar una serie de aspectos pesqueros relativos a la extracción del camarón excavador *Callichirus seilacheri*. Esta especie llamada comúnmente coloncho por los recolectores locales es intensamente capturada y comercializada como carnada para la pesca deportiva en la costa del Pacífico de América Central. Los resultados indican que el esfuerzo pesquero varió entre 4 y 14 recolectores día^{-1} con un alto porcentaje de ellos procedentes de la misma comunidad (70-100%). Las capturas diarias variaron entre 76 y 1120 camarones dependiendo principalmente del esfuerzo pesquero realizado por recolectores locales (R^2 = 0,88). La densidad de colonchos fue de 1,2 ± 0,88 ind m^{-2} y su abundancia total en el Estero de Mata de Limón fue estimada en 49.607 ± 3.638 individuos. Las hembras ovígeras estuvieron presentes de mayo a noviembre, con un máximo en septiembre. Los resultados de este estudio indican que la población de colonchos puede estar en grave riesgo de sobre-explotación si las capturas diarias superan los 800 individuos. Por ello, se recomienda la implementación de una veda total durante el pico de reproducción de *C. seilacheri* de manera de que este recurso local sea protegido y conservado para su uso sostenible. Se sugiere además la implementación de un plan de manejo entre la comunidad de Mata de Limón y el Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPESCA) de manera de optimizar y legalizar la extracción de este recurso.

Palabras clave: *Callichirus seilacheri*, manejo sostenible, extracción de camarones, comunidad, Mata de Limón.

The community of Mata de Limón, central Pacific coast of Costa Rica and the extraction of colonchos *Callichirus seilacheri* (Bott, 1955) (Decapoda: Axiidea: Callianassidae)

ABSTRACT. We conducted monthly visits to the coastal community of Mata de Limón (December 2011 to November 2012) in central Pacific of Costa Rica for assessment the extraction of the burrowing shrimp called coloncho *Callichirus seilacheri*, a species intensely caught as bait for fishing along the Pacific coast of Central America. The outcomes indicate that fishery effort varied between 4 and 14 harvesters day^{-1} with a high percentage of them from the same community (70-100%). Daily catch varied between 76 and 1120 shrimps and its value was strongly correlated with catches realized for the local harvesters (R^2 = 0.88). The shrimps density and total abundance in Mata de Limón was estimated in 1.2 ± 0.88 ind m^{-2} and 49,607 ± 3,638 individuals, respectively. Ovigerous females were exclusively present between May and November, peak in September. According to our outcomes, population of *C. seilacheri* in Mata de Limón could be in risk of overfishing if the daily catches exceed 800 individuals. The main results of the present study allow recommend the implementation of a total fishing ban during the reproduction peak of *C. seilacheri* directed to protection and conservation of this local resource for its sustainable harvesting. Also, we suggest the establishment of a management program between the community of Mata de Limón and the Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPESCA) in order to optimize and legalize the extraction of this important resource.

Keywords: *Callichirus seilacheri*, sustainable management, harvesting shrimp, community, Mata de Limón.

Corresponding editor: Luis Miguel Pardo

El camarón intermareal *Callichirus seilacheri* (Bott, 1955) (Callianassidae) es uno de los macroinvertebrados excavadores más característicos en las playas de arena del Pacífico Este (Hendrickx, 1995; Sakai, 1999). Su distribución geográfica abarca desde el Estero de Pérula, México hasta la playa de Caldera, Costa Rica (Ayón-Parente *et al.*, 2014; Hernáez, 2014), donde esta especie construye madrigueras simples habitadas de forma solitaria por un macho o una hembra (Hernáez, 2014). *C. seilacheri* no es actualmente considerado un recurso pesquero a lo largo de su distribución, sin embargo, posee gran importancia como recurso local en varias comunidades costeras de América Central donde es frecuentemente extraída como carnada para la pesca deportiva (Hernáez, 2014).

En la costa del Pacífico central de Costa Rica, *C. seilacheri* es intensamente capturado y comercializado bajo el nombre de coloncho y su extracción es una actividad característica de la comunidad de Mata de Limón. Sin embargo, es realizada en completo desconocimiento de todos los aspectos pesqueros relacionados con su extracción y ciclo de vida. En el presente estudio se analizó el esfuerzo pesquero, identidad de los recolectores, capturas diarias y captura por unidad de esfuerzo de colonchos en la comunidad costera de Mata de Limón. Asimismo, se analizó la evolución de tallas y variación mensual de las hembras ovadas en esta comunidad para establecer recomendaciones que puedan ser utilizadas en la futura gestión participativa o co-manejo de este recurso.

Para ello, se visitó mensualmente desde diciembre 2011 a noviembre 2012, el estero de Mata de Limón (09°55'12"N, 84°42'37"W), costa del Pacífico central de Costa Rica, donde *C. seilacheri* es intensamente capturado (Figs. 1a-1c). Durante este periodo se contabilizó mensualmente el número de recolectores (esfuerzo pesquero) que participan en la extracción de colonchos (recolectores día^{-1}) así como su identidad, si pertenecían a la comunidad de Mata de Limón (recolector local) o venían de otras localidades a extraer los colonchos (recolector foráneo). La captura diaria se estimó como el número de colonchos por día. Para determinar si la extracción de colonchos depende principalmente del esfuerzo realizado por recolectores locales o foráneos, el esfuerzo pesquero (local y foráneo) y la captura diaria se relacionaron mediante un análisis de regresión lineal (y = a + bx), previa transformación (log) de ambas variables para cumplir con el supuesto de normalidad (Shapiro & Wilk, 1965). El mejor ajuste fue definido a través del coeficiente de determinación (R^2) de cada relación.

La cadena de comercialización del coloncho se estimó mediante consulta efectuada a cada recolector en la que se les preguntó si: a) venden su producto a través de familiares, b) venden su producto a través de algún intermediario que no es pariente y c) si lo capturan para ser usado por ellos mismos como carnada para la pesca costera. Los puntos de venta de colonchos y su respectivo precio y forma de venta de los camarones también se determinaron mediante visitas periódicas al pueblo de Mata de Limón.

Para obtener información mensual de la evolución de tallas, se realizaron colectas mensuales de colonchos en toda el área de distribución de los camarones en el estero de Mata de Limón. El diseño de muestreo fue sistemático, con seis transectos separados cada 80 m y dispuestos de forma perpendicular a la línea de marea (Fig. 1b). Considerando que *C. seilacheri* habita en forma solitaria sus madrigueras (Hernáez, 2014), la densidad poblacional se estimó mediante conteo del número de madrigueras localizadas dentro de unidades de muestreo de 1 m^2 por cada transecto. Luego, la densidad total se determinó según el valor promedió entre los seis transectos. Los camarones fueron colectados desde cada transecto con una bomba de sedimento manual (77 mm diámetro, 100 cm largo), la que es muy eficiente para la captura de organismos que viven dentro de madrigueras (Rodrigues, 1966). En cada madriguera se realizaron cinco bombeos y se registró el número de ejemplares colectados por madriguera, también se consignó, la presencia de hembras portadoras de huevos. Los ejemplares colectados fueron cuidadosamente lavados con agua de mar y luego preservados en alcohol etílico (80%) hasta su posterior análisis.

Con un pié de metro (± 0.1 mm) a cada ejemplar se le midió la longitud del cefalotórax (LC, desde la región anterior del rostro al margen posterior del cefalotórax) y se identificó su sexo según el criterio propuesto por Hernáez (2014). Para establecer la existencia de una posible relación entre el tamaño corporal de los machos y hembras a través del tiempo, el tamaño promedio de cada sexo fue correlacionado mediante el coeficiente de producto-momento de Pearson (Zar, 1995). El porcentaje mensual de hembras ovígeras se graficó *versus* las capturas diarias para determinar si la presión de pesca fue más intensa durante los meses en que la especie se reproduce.

El esfuerzo pesquero varió entre 4 y 14 recolectores día^{-1} (8 ± 2,4) siendo estos valores extremos registrados en julio y agosto, respectivamente. La captura diaria varió entre 76 y 1120 camarones y siguió una tendencia similar al esfuerzo pesquero total (número de recolectores locales+foráneos) observado a lo largo del periodo de estudio (Fig. 2a), mostrando una correlación directamente proporcional que se comportó linealmente a través del tiempo (Pearson: r = 0,98; n = 12; P < 0,0001). Entre un 70 y 100% del esfuerzo de pesca

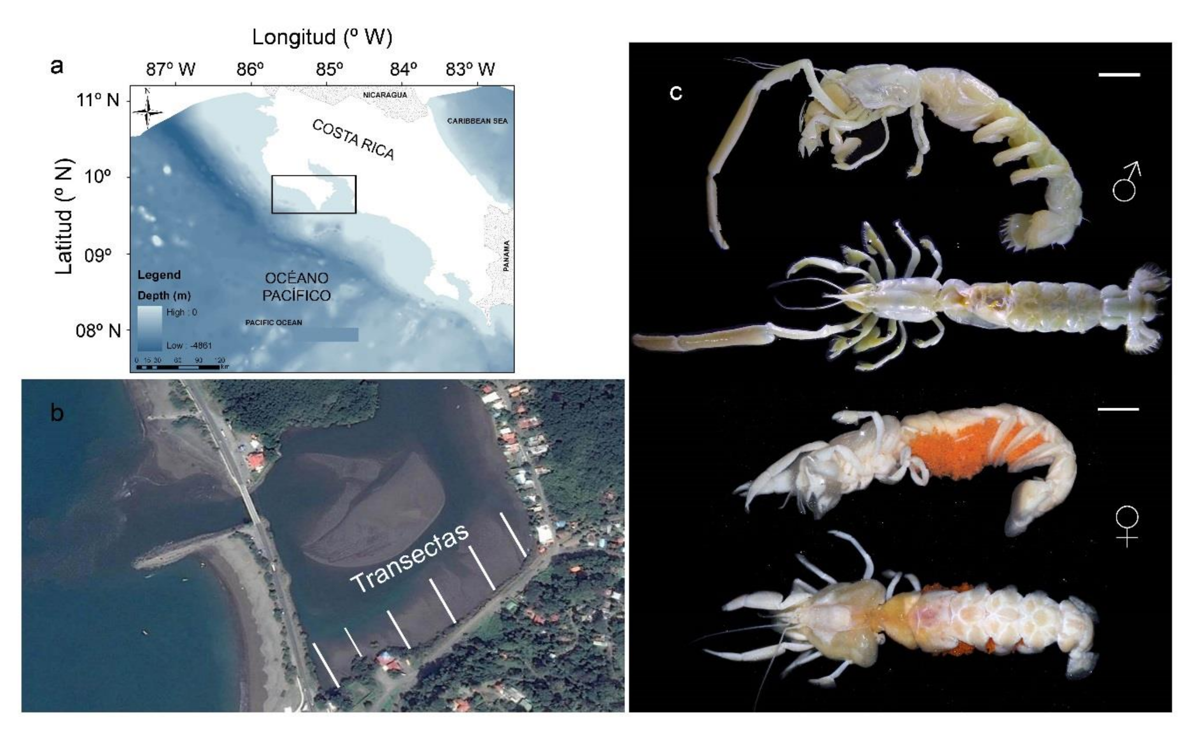


Figura 1. a) Localidad de Mata de Limón, costa del Pacífico central de Costa Rica, b) vista aérea del Estero de Mata de Limón con la ubicación de las transectas de estudio, c) vista lateral izquierda y dorsal de un macho y una hembra de *Callichirus seilacheri*. Barra de escala = 1 cm.

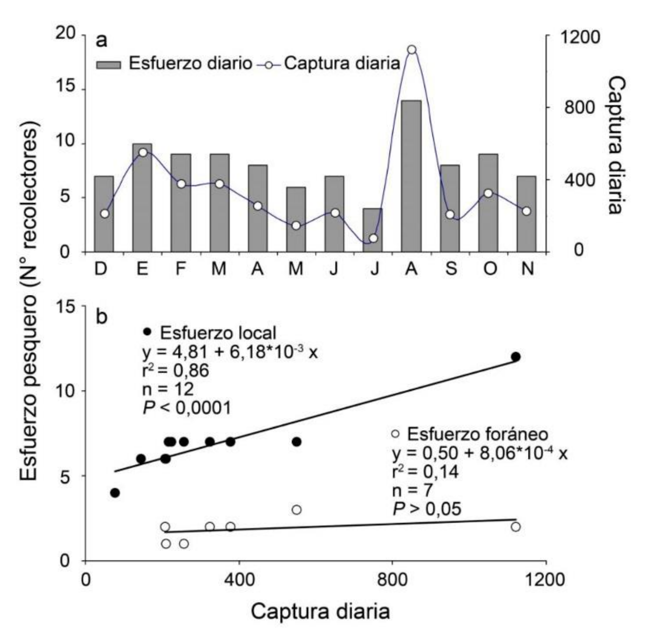


Figura 2. Variación mensual del esfuerzo pesquero y de la captura diaria. a) Ajuste lineal entre el esfuerzo pesquero local y foráneo, b) captura diaria de camarones.

mensual fue realizado por recolectores que provienen de la misma localidad de Mata de Limón. Así, la captura diaria fue fuertemente dependiente de la participación de los recolectores locales, no así de aquellos provenientes de otras localidades (Pearson: $r = 0,88$; n = 12; $P < 0,001$; Fig. 2b). Este esquema indicó que la comunidad de Mata de Limón tiene gran injerencia sobre la actividad de extracción de colonchos lo que facilitaría la implementación de cualquier plan de gestión que involucre a la misma comunidad tal como ha sido hecho en países como Filipinas y Chile (Kalton *et al.*, 1997; Bravo-Barnes *et al.*, 2006).

Conforme a los resultados de este estudio, la mayor parte de los recolectores (62,2%) venden su producto a través de venta directa (US$4-6 la docena), mientras que un 20,4% lo entregan a un intermediario para que sea comercializado (>US$3 la docena) y sólo una menor fracción de los recolectores (17,4%) lo usan como carnada para la pesca deportiva (Fig. 3). Es importante mencionar que esta pequeña fracción de recolectores que usan los colonchos como carnada para la pesca proviene de otras localidades geográficas. El gran porcentaje de recolectores de origen local que participan en la extracción y comercialización de colonchos, confirma que la comunidad de Mata de Limón se identifica con la extracción de este camarón. Este requisito de "identidad cultural" de la comunidad hacia el recurso, es fundamental para la creación de cualquier programa de gestión sostenible en el que el

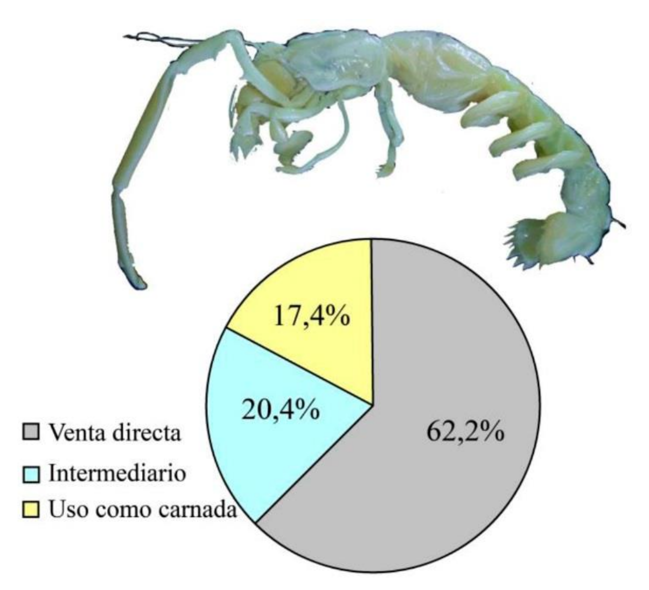


Figura 3. Vías principales de comercialización de los camarones recolectados (*Callichirus seilacheri*). En color gris la venta directa a través de familiares, en turquesa la venta a través de un intermediario y en amarillo el uso directo como carnada para la pesca costera.

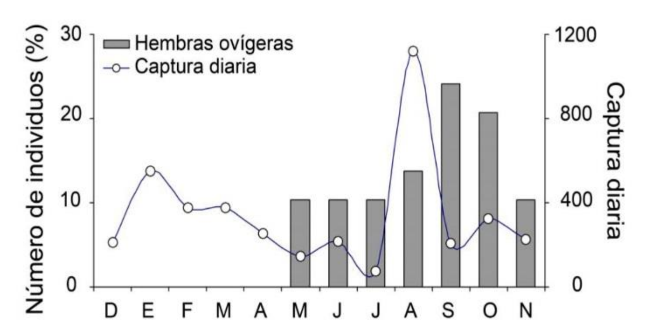


Figura 4. Porcentaje mensual de hembras ovígeras *versus* la captura diaria en *Callichirus seilacheri* procedente de la localidad de Mata de Limón, costa del Pacífico central de Costa Rica.

gobierno y la comunidad puedan interactuar para obtener beneficios para todos (Defeo & Castilla, 2012).

La densidad de *C. seilacheri* fue de 1,2 ± 0,88 ind m^{-2} con una abundancia total estimada en 49.607 (± 3.638 ind) para un área total de distribución en el Estero de Mata de Limón de 41.339 m^2. El valor de la densidad de *C. seilacheri* fue notoriamente menor al reportado para *C. garthi* (7,2 ± 5,92 ind m^{-2}) de la costa de Chile cuyos ejemplares también son capturados y comercializados como carnada para la pesca deportiva (Hernáez & Wehrtmann, 2007; Hernáez, 2014). El valor de la densidad de los colonchos fue altamente variable (= 73%); es decir, la distribución de las madrigueras no fue uniforme en toda el área del Estero de Mata de Limón. Por otro lado, considerando que el valor máximo de las capturas diarias fue de 1.120 individuos, la captura mensual podría alcanzar a 33.600 individuos. Es decir, más de la mitad (67,7%) de la población total de colonchos en el Estero de Mata de Limón podría ser capturada en sólo un mes con este valor de capturas diarias. Esto es importante ya que se sugiere que la mortalidad por pesca no debe superar el 50% del total de las muertes en cualquier población natural sometida a un esfuerzo de captura, pues cuando esto sucede la reproducción y el reclutamiento se ven afectados (Cushing, 1968; Gulland, 1971). Este resultado permite proponer que cualquier valor de esfuerzo de pesca superior a 800 ind $día^{-1}$, pondría en riesgo el delicado estado de conservación de la población natural de *C. seilacheri* en el Estero de Mata de Limón.

En total se capturaron 234 machos y 222 hembras durante las colectas mensuales, incluyendo un total de 30 hembras ovígeras (Tabla 1). El tamaño de machos y hembras varió de 2,9 a 17,8 mm LC (10,7 ± 3,08 mm LC) y de 5,2 a 18,4 mm LC (11,3 ± 2,95 mm LC), respectivamente (Tabla 1). La mayor parte de los machos (73,7%) y hembras (72,5%) midió entre 8,1 y 14,0 mm de LC, mientras que el tamaño de las hembras ovígeras varió de 12,2 a 17,2 mm LC. El tamaño corporal de los machos y las hembras estuvo correlacionado durante el periodo de estudio (Pearson: $r = 0,66$; $n = 12$; $P < 0,05$). Las hembras ovígeras estuvieron presentes exclusivamente de mayo a noviembre, con un máximo en septiembre de 24% de hembras ovígeras con respecto al total de las hembras colectadas durante ese mes (Fig. 4). Las capturas diarias no se relacionaron estadísticamente con la variación temporal de las hembras ovígeras (Pearson: $r = 0,00$; $n = 12$; $P > 0,05$). Sin embargo, el máximo de las capturas de colonchos coincidió con el periodo agosto-octubre cuando la reproducción fue más intensa (Fig. 4). La protección de las hembras ovígeras en *C. seilacheri* debe ser uno de los requisitos fundamentales para asegurar el ingreso de nuevos individuos a la población (reclutas). Esto constituye un aspecto esencial para la implementación de cualquier plan de manejo sostenible para un recurso (Fernández & Castilla, 2000; Hernáez & Wehrtmann, 2014). En el caso de la comunidad de Mata de Limón, se recomienda ajustar el esfuerzo de pesca al ciclo reproductivo de la especie, así como reducir las capturas a un 50% durante toda la época reproductiva, con la recomendación de una veda total durante el máximo reproductivo en septiembre. Este plan de manejo debe también considerar el monitoreo permanente de la población, especialmente respecto a la aparición de hembras ovígeras, de forma de ajustar cada una de las restricciones sugeridas anteriormente a las variaciones anuales de la población de colonchos.

Tabla 1. Número, promedio y desviación estándar (DE) de los ejemplares de *Callichirus seilacheri* colectados mensualmente en Mata de Limón, Pacifico central de Costa Rica. LC: longitud del cefalotórax, n: número de ejemplares.

Mes	Machos		Hembras (hembras ovígeras)	
	n	LC: Promedio ± DE	n	LC: Promedio ± DE
diciembre	14	9,9 ± 1,91	16 (0)	10,02 ± 1,88
enero	29	9,0 ± 2,49	26 (0)	10,71 ± 2,05
febrero	26	10,5 ± 2,12	16 (0)	10,26 ± 2,17
marzo	30	10,1 ± 2,49	12 (0)	11,20 ± 1,82
abril	18	11,1 ± 1,72	14 (0)	11,50 ± 2,26
mayo	16	12,0 ± 2,98	8 (2)	13,60 ± 2,18
junio	15	12,6 ± 1,75	16 (2)	12,64 ± 1,75
julio	7	12,3 ± 2,97	12 (2)	13,14 ± 2,46
agosto	36	13,1 ± 2,25	44 (4)	12,60 ± 2,19
septiembre	8	10,3 ± 3,10	18 (10)	13,41 ± 2,51
octubre	17	11,6 ± 4,34	26 (8)	13,41 ± 4,00
noviembre	18	10,9 ± 2,73	14 (2)	10,92 ± 2,45
Total	234	10,7 ± 3,08	222 (30)	11,3 ± 2,95

El interés por recolectar colonchos ha aumentado durante los últimos años en la comunidad de Mata de Limón debido a la falta de oportunidades de trabajo. En esta misma línea de razonamiento, si se considera que la reproducción de *C. seilacheri* en Mata de Limón es de tipo estacional, entonces es de esperar que esta población no sea capaz de mantener su nivel de densidad actual ante cualquier cambio que afecte la reproducción (*e.g.*, evento El Niño) o el reclutamiento (*e.g.*, sobrepesca). Por ello, es urgente la implementación de un plan de manejo que incorpore a la comunidad de Mata de Limón en la gestión y administración del recurso, especialmente si se quiere preservar la identidad cultural de esta actividad así como el estado poblacional de los colonchos que habitan en esta localidad. Desde esta perspectiva, la figura del manejo participativo o co-manejo (Carlsson & Berkes, 2005), aparece como una alternativa adecuada para mantener a la comunidad de Mata de Limón y al gobierno (Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura), para obtener beneficios para todos.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece la ayuda de Alexandra Gamboa que participó en la mayor parte de las actividades de colecta de camarones realizadas en el presente estudio. Ambos autores agradecen a la comunidad de Mata de Limón por su desinteresada colaboración durante las entrevistas. También los autores agradecen a los dos revisores anónimos y al editor del área por sus valiosos comentarios tendientes a mejorar la versión inicial del documento. El financiamiento para realizar el presente estudio provino de fondos propios que el primer autor dispuso a partir de su beca de doctorado (CAPES-Brazil 2010-2012, CONICYT-Chile 2012-2014). Este estudio cumplió con las leyes de Costa Rica en cuanto al manejo de animales silvestres.

REFERENCIAS

Ayón-Parente, M., M.E. Hendrickx, E. Ríos-Jara & J. Salgado-Barragán. 2014. Records of mud shrimps (Crustacea: Decapoda: Axiidea and Gebiidae) from Pacific Mexico. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 94(2): 369-388.

Bravo-Barnes, P., D. Yañez, J. Barrios, M. Pérez, M. Cifuentes, N. Godoy, P. Hernáez, A. Pérez, M. Thiel & W. Stotz. 2006. Pesca y turismo, actividades complementarias que pueden contribuir a la conservación de un hábitat único: el caso del ostión del norte y del pasto marino en Puerto Aldea, Chile. Policy Matters, 14: 269-271.

Carlsson, L. & F. Berkes. 2005. Co-management: concepts and methodological implications. J. Environ. Manage., 75: 65-76.

Cushing, D.H. 1968. Fisheries biology: a study in population dynamics. University of Wisconsin Press, Madison, 200 pp.

Defeo, O. & J.C. Castilla. 2012, Governance and governability of coastal shellfisheries in Latin America and the Caribbean: multi-scale emerging models and effects of globalization and climate change. Curr. Opin. Environ. Sustain., 4: 344-350.

Fernández, M. & J.C. Castilla. 2000. Recruitment of *Homalaspis plana* in intertidal habitats of central Chile and implications for the current use of management and marine protected areas. Mar. Ecol. Prog. Ser., 208: 157-170.

Gulland, J.A. 1971. The fish resources of the ocean. Fishing New (Books), Surrey, 255 pp.

Hendrickx, M.E. 1995. Checklist of lobster-like decapod crustaceans (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea, Astacidea and Palinuridea) from the eastern tropical Pacific. An. Inst. Biol., Univ. Nac. Auton. Mex. Zool., 66: 155-163.

Hernáez, P. 2014. Estado taxonômico e historia de vida de *Callichirus seilacheri* (Bott, 1955) (Decapoda, Axiidea, Callianassidae) na costa do Pacífico Leste: ecologia reprodutiva em ambientes tropicais e relação entre a abundância e a variabilidade latitudinal dos atributos populacionais na costa do Chile. Ph.D. Thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, 151 pp.

Hernáez, P. & I.S. Wehrtmann. 2007. Population biology of the burrowing shrimp *Callichirus seilacheri* (Decapoda: Callianassidae) in northern Chile. Rev. Biol. Trop., 55: 141-152.

Hernáez, P. & I.S. Wehrtmann. 2014. Breeding cycle of the red squat lobster *Pleuroncodes monodon* H. Milne Edwards, 1837 (Decapoda, Muninidae) from deepwater Pacific of Costa Rica. Mar. Ecol., 35: 204-211.

Kalton, B., R.S. Pomeroy & A. Salamanca. 1997. The marine conservation project for San Salvador: a case study of fisheries co-management in the Philippines. ICLARM, Manila, Working Paper 23.

Rodrigues, S.A. 1966. Estudos sobre *Callianassa*: sistemática, biologia e anatomia. Ph.D. Thesis. Universidade de São Paulo, São Paulo, 233 pp.

Shapiro, S.S. & M.B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika, 52: 591-611.

Sakai, K. 1999. Synopsis of the family Callianassidae, with keys to subfamilies, genera and species, and the description of new taxa (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea). Zool Verh. Leiden, 326: 1-152.

Zar, J.H. 1995. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 947 pp.

Received: 22 August 2014; Accepted: 29 November 2014

Short Communication

Characterization of Baker Fjord region through its heavy metal content on sediments (Central Chilean Patagonia)

Ramón Ahumada[1], Elizabeth González[1], Christian Díaz[2] & Nelson Silva[3]
[1]Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción
Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile
[2]Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de la Santísima Concepción
Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile
[3]Escuela de Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso
Av. Altamirano 1480, Valparaíso, Chile
Corresponding author: Ramón Ahumada (rahuma@ucsc.cl)

ABSTRACT. The spatial distribution of heavy metals content (Ba, Cd, Cu, Pb, Sr and Zn) in sediments of the Baker Fjord and surrounding channels in the central region of the Chilean fjords (47°45'S, 48°15'S) is analyzed. The aim of the study was characterized the patterns of abundance and distribution of these metals in surface sediments. The area corresponds to a poorly studied zone with low human activity. Distribution patterns would be influenced by rainfall conditions (local erosion), fluvial (continental sediments carried by rivers), glacier (glacier flour) and estuarine circulation. Cluster analysis allows differentiation among the sampled sites and group with similar characteristics. Finally, the concentrations found were contrasted with average values of metamorphic rocks and show with some certainty that the values found for calendar for this area and the greatest concentrations are the result of natural enrichment.

Keywords: heavy metals, unpolluted sediments, fjords, Patagonia, Chile.

Caracterización de la región del fiordo Baker en relación al contenido de metales pesados en los sedimentos (Patagonia Central de Chile)

RESUMEN. Se analiza la distribución espacial del contenido de metales pesados (Ba, Cd, Cu, Pb, Sr y Zn) en sedimentos del Fiordo Baker y canales aledaños, en la región central de los fiordos patagónicos chilenos (47°45'S, 48°15'S). El objetivo del estudio fue caracterizar los patrones de abundancia y distribución de estos metales en los sedimentos superficiales. La zona corresponde a un área escasamente estudiada con baja actividad antrópica. Los patrones de distribución estarían influenciados por condiciones pluviales (erosión local), fluvial (sedimentos continentales arrastrados por los ríos), glaciar (harina de glaciar) y circulación estuarina. El análisis de conglomerados permite establecer diferencias entre los sitios muestreados y agruparlos con características semejantes. Finalmente, las concentraciones encontradas fueron contrastadas con valores promedios de rocas metamórficas y muestran con cierta certidumbre, que los valores encontrados corresponden a los naturales para esta zona y las concentraciones mayores son producto de enriquecimiento natural.

Palabras clave: metales pesados, sedimentos no contaminados, fiordos, Patagonia, Chile.

The Baker Fjord is located in the extreme north-eastern zone of the Central Chilean Patagonian Fjords (~48°00'S), in between the Northern and Southern Patagonian Ice Field Glaciers. The basin of the Baker Fjord disrupts the continuity of these two glacier systems, and it receives inflow from the Baker (870 $m^3 s^{-1}$) and Pascua (574 $m^3 s^{-1}$) rivers. This fjord is also influenced by marine waters coming from the Gulf of Penas generating a two layer estuarine circulation system (Pickard, 1971; Sievers & Silva, 2006).

The scarce population of this region (0.1 inhabitants km^{-2}; INE, 2012) minimizes the possible influence of human activity in the area. Therefore the fjord sediment's metal content should be representative of

Corresponding editor: Ricardo Prego

concentrations due to erosion and the natural lixiviation of the rocks that form the geological landscape (Ospina-Alvarez *et al.*, 2014). The first study concerning sediment metal composition of Baker Fjord area was performed in 1997 during the research cruise CIMAR 2 Fiordos (Ahumada & Contreras, 1999; Ahumada, 2006). In this study the metal content was analyzed only at three oceanographic stations, generating a limited amount of information. In 2009 during the CIMAR 14 Fiordos cruise, new sediment samples were taken at seven oceanographic stations, with the objective of characterizing its surface sediment through the analysis of its metal content. Specific aims were to identify areas of enrichment and the patterns of distribution of six metals (Zn, Ba, Cu, Sr, Pb and Cd) and its association with adjacent continental basins. The sampling was performed on board the research vessel R/V "AGOR Vidal Gormaz" between October 27th and November 26th 2009, where seven oceanographic stations were sampled with a box corer (box size 30x30x40 cm) (Fig. 1). From each box corer, 4 to 6 subsamples were taken with a 30 cm long PVC tube of 10 cm in diameter.

The samples were sealed with PCV lids to keep them humid and stored in a freezer until their physical and chemical analyses, at the Laboratorio de Oceanografía Química of Universidad Católica de la Santísima Concepción (UCSC). From each subsample, the upper 3 cm of the sediment were extracted and divided in four portions or quarters. One was used to analyze sediment texture and the second quarter was used to analyze total organic material (TOM). Texture was determined by means of the wet method and sieved according the Udden Wentworth grain-size scale (Fütterer, 2000). The TOM content was gravimetrically determined using the weight loss-on-ignition method (Mook & Hoskin, 1982) burning the dry sediment subsample in a furnace at a temperature of 450ºC.

The third subsample quarter was used for the metal analysis and the last one was kept as a reference sample. These subsamples were dried and crushed in an agate mortar until very fine dust. 0.5 g were extracted and subjected to acid digestion (HNO_3, HF, and $HClO_4$), which was carried out in covered Teflon cups at 70ºC until the samples were dry. The residue was dissolved in 10 mL of HCl Suprapur® (Merck) and gauged to 25 mL using Milli-Q (EMD Millipore). Following this, 50 µL of the acid fraction were analyzed using thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) in a GBC 902 atomic absorption spectrophotometer (González *et al.*, 2004). For metal determinations, MESS-3 Certified Reference Materials were used.

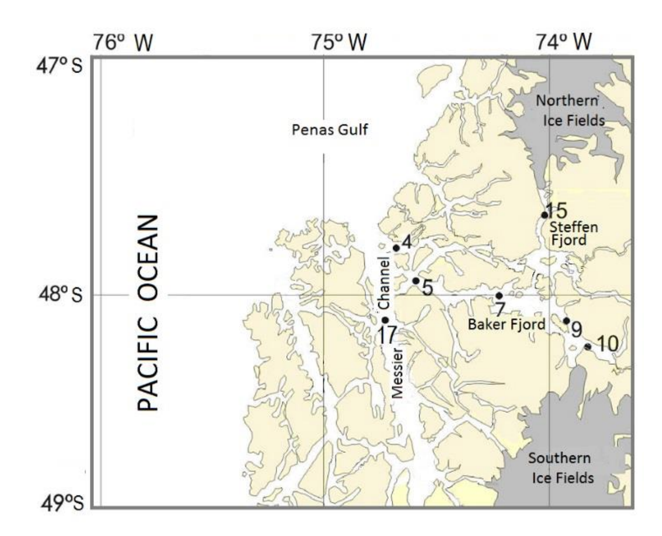


Figure 1. Position of sampling sites used within the area of study.

Once the analytic data was obtained, the geoaccumulation index (Igeo) was computed according to Müller (1979):

$$Igeo = \log_2 (Cm/1.5\ Bn)$$

where: Cm = experimentally measured mean concentration; Bn = background superficial sediments, using the baseline value previously established by Ahumada (2006) for this central fjord region, *i.e.*, Ba = 649.7 µg g^{-1}; Cu = 18.0 µg g^{-1}; Pb = 27.6 µg g^{-1}; Sr =155.8 µg g^{-1}; and Zn = 102.5 µg g^{-1}.

The enrichment factor was calculated according to Chester (2003):

$$FE = (CExp\ m / CExp\ n) / (CBn\ m / CBn\ n)$$

where: CExp*m= experimentally measured concentration; CExp*n= experimentally measured concentration of the standardization element; CBn*m = base line (background) concentration of the metal; and CBn*n = background concentration of the standardization element.

The geoaccumulation index (Table 1) and enrichment factor (Table 2) were conceptually defined for the sake of interpretation.

The relation between metals and sample sites was analyzed through bilateral Pearson correlations ($P < 0.0001$). A dendrogram was used for the exploratory analysis of characteristic patterns of distribution, and a multivariate analysis was applied to group the sampling sites considering their metal concentrations and spatial dispersion.

Table 3 lists the characteristics of the collected sediments, and it is possible to observe that five of the sampling site had a depth of more than 300 m.

Table 1. Scale and concepts used for interpreting the values obtained by the geoaccumulation index (Igeo). Source: Modified from Ahumada (2006).

Igeo scale	Igeo interval	Concept
0	Igeo ≤ 0.0	Pristine or unaltered.
1	0.0 < Igeo ≤ 1.1	Uncontaminated or slightly altered.
2	1.1 < Igeo ≤ 2.1	Slightly or moderately contaminated.
3	2.1 < Igeo ≤ 3.1	Moderately to highly contaminated.
4	3.1 < Igeo ≤ 4.1	Highly to extremely contaminated.
5	4.1 < Igeo ≤ 5.0	Extremely contaminated.
6	Igeo > 5.0	Requires remediation studies.

Table 2. Scale and concepts used for interpreting total values of metal concentration obtain through the application of the enrichment factor (EF). (Modified from Lawson & Winchester, 1979).

Intervals of EF	Source or origin of metal
0.0 < EF ≤ 1.5	Product of erosion from parent rock.
1.5 < EF ≤ 3.0	Enriched through sedimentary processes: soft sediment, organic material, inorganic precipitates.
3.0 < EF ≤ 6.2	Enriched from external sources.
EF > 6.2	Contamination through human activities.

Table 3. Grain-size of sediments (*i.e.*, texture) determined by the Udden Wentworth (U-W) scale, including soil moisture (SM) and total organic material (TOM).

Site	Depth (m)	1.00-0.50 mm (%)	0.51-0.25 mm (%)	0.26-0.12 mm (%)	0.13-0.06 mm (%)	< 0.07 mm (%)	Texture (U-W)	Color	SM (%)	TOM (%)
4	550	3.20	1.63	4.50	11.72	74.82	VFS-Sil	Grey	---	4.9
5	505	0.02	0.03	0.07	0.90	98.32	Sil-Cla	Grey-Brown	43.21	5.6
7	706	0.07	1.45	0.67	0.36	97.40	Sil-Cla	Grey-Brown	50.80	5.1
9	401	0.05	2.17	1.04	0.49	96.26	Sil-Cla	Grey-Brown	45.65	3.5
10	278	0.12	1.07	9.82	20.57	67.45	VFS-Cla	Dark Grey	35.09	2.7
15	108	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	Sil-Cla	Grey-Brown	37.26	2.6
17	938	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	Sil-Cla	Grey-Green	38.50	3.7

The collected sediment was predominated by grey silt-clayed sediment (>95%). Two sites (4 and 10) were an exception to this tendency, with presence of coarse, fine and very fine sand (> 25%). TOM content fluctuated between 2.6 and 5.6, with higher values towards the oceanic zone. The color of the sediment varied from clear grey to a clear grey/brown and until a dark grey (Table 3).

The metals analytical results were averaged and shown in Table 4. Relative abundance metals values, were the same for all sampled fjords and sites, with the following order: Ba > Sr > Zn > Pb > Cu > Cd. The exception to this was found for Steffen Fjord, where Sr was found in greater concentration than Ba.

Table 5 shows the co-variation of the metal concentrations, which was calculated through the Pearson correlation coefficient (r). Zn presented a significant positive correlation with Ba, Cu, and Pb, and a significant negative correlation with Sr ($P < 0.0001$). Moreover, a positive correlation was observed between Cu and Pb ($P < 0.0001$). Concentrations of Sr and Cd were dominant at inland sites, suggesting a more continental origin, whereas Ba and Zn were dominant at sampling sites with coastal influence.

Patterns of distribution and abundance of metal contents in sediments were examined through cluster analysis, with the aim of establishing the sources of origin and the compositions associated with the areas of influence conditions. The results estimated considering three Euclidean distances (Fig. 2) allowed us to distinguish three basins. The head of the Steffen Fjord basin which is influenced by the Steffen Glacier (site 15), which originates from the Northern Patagonian Ice Field; the mouth of the Baker Fjord which correspond

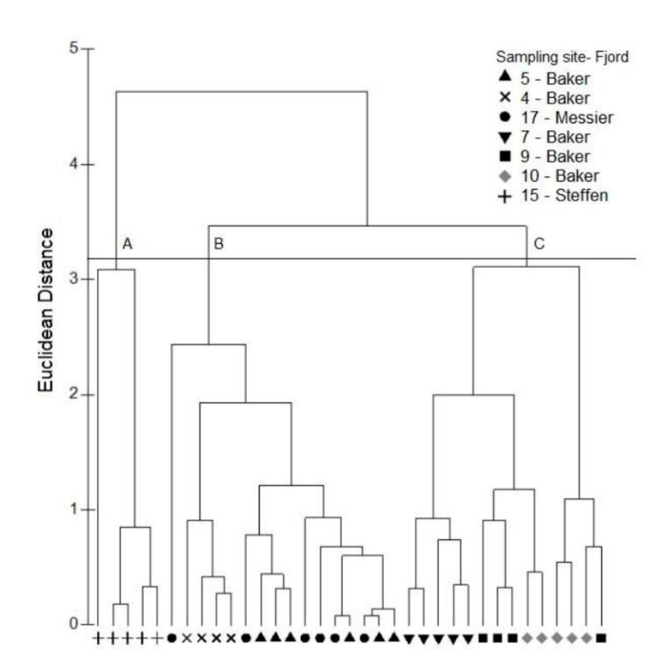


Figure 2. Dendrogram of sampling sites from the Baker area, establishing relations of similarity where A) head of Steffen Fjord, B) mouth of Baker Fjord, and C) head of the Baker Fjord.

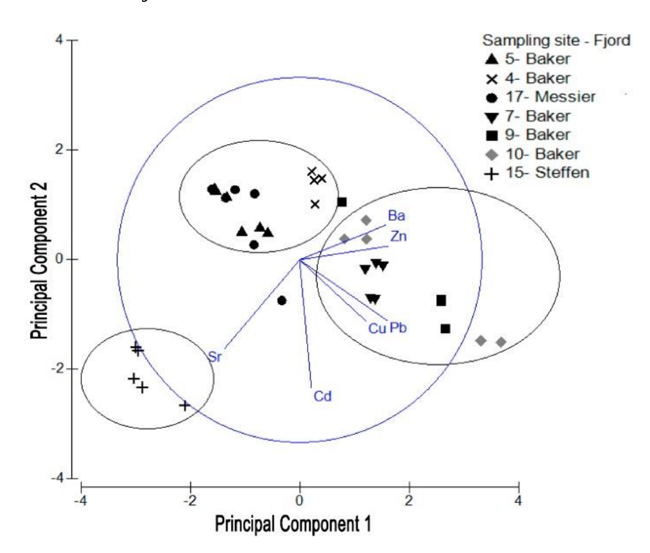


Figure 3. Spatial grouping pattern for the metal contents of the Baker area.

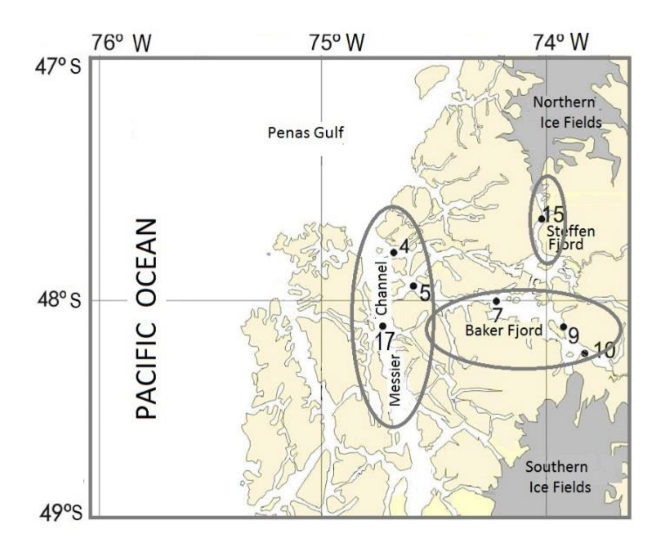


Figure 4. Grouping pattern of sampling sites according to sediment analysis of metal content and correlations.

to a confluence zone of estuarine and marine waters (sites 4, 5, and 17); and the head of the Baker Fjord influenced by the Pascua River fresh water drainage (sites 6, 9, 10).

In order to confirm the patterns inferred through the cluster analysis, a new classification analysis was performed (Fig. 3).

This analysis confirmed the previous observations and defined the same spatial groups. (*i.e.*, sites 15 (Steffen), 4 (Baker), and 10 (Baker), located towards the extreme boundary of the studied area, while sites 9 (Baker) and 7 (Baker) were close to the influence of site 10, and sites 5 (Baker) and 17 (Messier) were under the influence of site 4 (Baker). These results reflect the coastal influence that extends towards the Messier Fjord (site 17). Site 15 showed the greatest distance and was influenced by the Steffen Glacier, which is part of the Northern Patagonian Ice Fields, is active, and is in retreat. Site 10 and those associated with it were influenced by the Pascua River.

The segregation established by the distribution patterns of the metals, as corroborated by the performed statistical tests and the geographic grouping of sampling sites (Fig. 4), would allow for making associations between distribution and local processes.

The computation of the Igeo index of the studied metals using the Ahumada´s (2006) base line values, give results less than 0, which corresponds to natural concentrations found in unaltered areas (Table 6). The calculated value for Sr (Igeo = 1.71) was obtained from the Steffen Fjord and is an exception to the pattern observed for other sites. This would indicate that the accumulation of fine sediments is due to the Steffen Glacier (Table 4).

The calculated EF values (Table 7) showed values less than 1.5. Those EF vales would confirm that metal concentrations in the sediments are originated from metals released from the parent rock.

When comparing the obtained average concentration values (Table 4) with averages from existing literature (Table 8), it appears that values for Zn could be associated with averages for basalts and shale (Libes, 1992). In turn, Cu and Pb content appear close to contents from granite, basalt, and shale, while, the content of Cd would be closest to shale due to its low concentration and high variance.

Table 4. Averaged concentrations of metals in fjord´s sediments (Unit ug g^{-1}, dw).

Fjord	Site	Ba	Sr	Zn	Pb	Cu	Cd
Baker	4	669.5	112.5	89.3	23.5	16.5	0.2
Baker	5	501.0	300.0	87.2	17.4	14.0	0.2
Baker	7	627.6	213.4	106.2	31.4	25.2	0.3
Baker	9	657.5	197.0	125.0	33.5	27.3	0.4
Baker	10	584.0	215.4	136.4	32.2	29.6	0.3
Steffen	15	321.0	764.0	62.8	20.4	19.6	0.4
Messier	17	501.0	300.0	89.8	17.4	15.0	0.2

Table 5. Bivariate correlations (r) of metal content from the Baker Fjord. ***$P < 0.0001$, **$P < 0.001$, *$P < 0.01$.

Metal	Coeff./Sig.	Zn	Ba	Cu	Sr	Pb	Cd
Zn	r	1.000	0.627***	0.648***	-0.675***	0.718***	-0.069
	P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.694
Ba	r		1.000	0.290	-0.870***	0.694***	0.058
	P			0.090	0.000	0.000	0.739
Cu	r			1.000	-0.151	0.685***	0.187
	P				0.387	0.000	0.282
Sr	r				1.000	-0.417**	0.338**
	P					0.013	0.047
Pb	r					1.000	0.482**
	P						0.003
Cd	r						1.000
	P						

Table 6. Geoaccumulation index (Igeo) values calculated from averaged data of each sampling site.

Fjord/channel	Site	Igeo Zn	Igeo Ba	Igeo Cu	Igeo Sr	Igeo Pb	Igeo Cd
Baker (n = 6)	5	-0.81	-0.96	-0.90	0.36	-1.20	-0.75
Baker (n = 5)	7	-0.53	-0.64	-0.08	-1.13	-0.38	-0.25
Baker (n = 4)	9	-0.29	-0.56	-0.04	-0.28	-0.30	-0.21
Baker (n = 5)	10	-0.17	-0.74	-0.15	-0.12	-0.36	-0.43
Messier (n = 6)	17	-0.77	-0.96	-0.79	0.36	-1.23	-0.88
Steffen (n = 5)	15	-1.28	-1.50	-0.42	1.71	-1.00	0.12

Table 7. Calculated values for the enrichment factor (EF).

Fjord/channel	Site	FE Zn	FE Ba	FE Cu	FE Sr	FE Pb	FE Cd
Baker (n = 6)	5	1.10	0.96	0.52	2.40	0.81	1.10
Baker (n = 5)	7	0.73	0.68	0.91	0.96	0.94	0.84
Baker (n = 4)	9	0.79	0.66	0.99	0.80	0.79	0.84
Baker (n = 5)	10	0.80	0.54	1.06	0.83	0.70	0.67
Messier (n = 6)	17	1.01	0.89	0.56	2.20	0.74	0.94
Steffen (n = 5)	15	0.55	0.44	0.72	4.39	0.67	1.50

The observed enrichment (*i.e.*, site 15, Steffen Fjord) would be due to the dynamic conditions and influences of specific zones (Glacial silt, see Table 3). Müller (1979) suggested increases up to 50% over the baseline for unaltered values (*i.e.*, the calculation algorithm for Igeo). Using this, it is possible to postu-

Table 8. Concentration values (dw µg g^{-1}), for comparative purposes, of metals reported in the existing literature for different marine localities. (1) Chester, 2003; (2, 3) Libes, 1992; (4*) Ahumada, *et al.* (2008); (4**) Silva, *et al.* (2009); (5) Ahumada *et al.* (2008); (6) This study; (7) Loring & Asmund (1996); (8 y 9) Prego & Cobelo-García, 2003.

Metal	Rock	Basalt	Granite	North Patagonia Fjords	Central Patagonia Fjords	Central Patagonia This study	East Greenland	Rias Gallegas	Unpolluted sediment
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
Ba	445	840	330	435,7 *	649.7	607.9	s/d	s/d	s/d
Sr	278	100	470	260,2 *	155.8	207.7	s/d	s/d	s/d
Zn	127	s/d	s/d	60.1 **	102.5	108.8	89.0	100	20-100
Cu	32	10	90	36.6 **	18.0	22.5	46.0	14	5-25
Pb	16	s/d	s/d	9.3 **	27.6	27.6	19.0	45	5-25
Cd	0.2	s/d	s/d	0.18 **	0.27	0.3	0.11	0.15	0.01-0.2

late that the present study area presented concentration values corresponding to the accumulation of glacier erosion and natural lixiviation of the rocks that form the geological landscape. The relative abundance of metals according to geological zone was found to be Ba > Sr > Zn > Cu > Pb > Cd, with concentrations of Ba = 552 µg g^{-1}; Sr = 300 µg g^{-1}; Zn = 100 µg g^{-1}; Cu = 22 µg g^{-1}; Pb = 25 µg g^{-1}; and Cd = 0.3 µg g^{-1} (Table 4). These values concur with the abundance and distributions patterns reported by Ahumada & Contreras (1999) and Silva *et al.* (2009) for the northern Patagonian fjords an compared with references values (Table 8).

The Baker study area was characterized by relatively homogeneous concentrations and with a variability derived from local specific processes, as determined through geological composition, and from processes related to glacier erosion, natural lixiviation, fluvial influences, and from advection derived from estuarial circulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the National Oceanographic Committee (CONA) for financing this study through CONA-C14F 08-01, granted to Ramón Ahumada B. We also thank the commander and crew of the R/V "AGOR Vidal Gormaz" for the assistance on board during CIMAR 14 Fiordos cruise, and Miss Emma Cascales for her help in sediment sampling. Finally, we thank to Professor A. Rudolph for her patient during the reviewing of the manuscript and to the Dirección de Investigación of the Universidad Católica de la Santísima Concepción for their additional support.

REFERENCES

Ahumada, R. 2006. Metales menores y trazas de los sedimentos superficiales de canales y fiordos australes. In: N. Silva & S. Palma (eds.). Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a Cabo de Hornos. Comité Oceanográfico Nacional, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 77-81 pp.

Ahumada, R. & S Contreras. 1999. Contenido de metales (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr, V y Zn) en sedimentos de los fiordos adyacentes a Campo de Hielo Sur y Canal Concepción. Cienc. Tecnol. Mar, 22: 24-41.

Ahumada R., A. Rudolph & S.M. Mudge. 2008. Trace metals in sediments of southeast Pacific Fjords, North Region (42.5° to 46.5°S). J. Environ. Monit., 10: 231-238.

Chester, R. 2003. Marine geochemistry. Blackwell Publishing, Malden, 505 pp.

Fütterer, D.K. 2000. The solid phase of marine sediments. In: D. Horst-Shulz & Mathias Zabel (eds.). Marine biogeochemistry. Springer-Verlag, Heilderberg, 455 pp.

González, E., R. Ahumada, V. Medina, J. Neira & U. González. 2004. Thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS): application for total determination of Cd, Pb and Zn in fresh waters, seawater and marine sediments. Quím. Nova, 27(6): 873-877.

Instituto Nacional de Estadística de Chile (INE). 2012. Censo Año 2012. [www.ine.cl] Reviewed: 10 March 2013.

Lawson, D.R. & J.W. Winchester. 1979. A standard crustal aerosol as a reference for elemental enrichment factors. Atmos. Environ., 10: 925-930.

Libes, S.M. 1992. An introduction to marine biogeochemistry. John Wiley & Sons, New York, 734 pp.

Loring, D.H. & G. Asmund. 1996. Geochemical factors controlling accumulations of major and trace element in Greenland coast and fjord sediments. Environ. Geol., 28(1): 2-11.

Mook, D. & C. Hoskin. 1982. Organic determinations by ignition: caution advised. Estuar. Coast. Shelf Sci., 15: 697-699.

Müller, G. 1979. Schwermetalle in den sedimenten des Rheins-Veränderungen seit. Umschau, 79: 778-783.

Ospina-Alvarez, N., M. Caetano, C. Vale, J. Santos-Echeandia & R. Prego. 2014. Prevalence of tide-induced transport over other metal sources in a geologically enriched temperate estuarine zone (NW Iberian Peninsula). J. Geochem. Explor., 140: 46-55.

Pickard, G. 1971. Some physical oceanographic features of inlets of Chile. J. Fish. Bd. Can., 28: 1077-1106.

Received: 1 September 2014; Accepted: 19 December 2014

Prego, R. & A. Cobelo-García. 2003. Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). Environ Pollut., 121: 425-452.

Sievers, H. & N. Silva. 2006. Masas de agua y circulación en los canales y fiordos australes. In: N. Silva & S. Palma (eds.). Avances en el conocimiento océano-gráfico de las aguas interiores chilenas, Puerto Montt a Cabo de Hornos. Comité Oceanográfico Nacional, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 53-58.

Silva, N., J. Haro & R. Prego. 2009. Metals background and enrichment in the Chiloe Interior Sea sediments (Chile). Is there any segregation between fjords, channels and sounds? Estuar. Coast. Shelf Sci., 82: 469-476.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 588-594, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-21

Short Communication

Primer registro de melanismo en *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833 (Perciformes, Cheilodactylidae)

Héctor Flores[1] & Hugo Poblete[2]
[1]Departamento de Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte
Larrondo 1281, Coquimbo, Chile
[2]Departamento de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte
Larrondo 1281, Coquimbo, Chile
Corresponding author: Héctor Flores (hflores@ucn.cl)

RESUMEN. El melanismo en peces es poco frecuente, se expresa en una mayor cantidad de especies de aguas límnicas que marinas. Se reporta la captura de un ejemplar hembra de *Cheilodactylus variegatus*, con melanismo completo. El individuo fue capturado con arpón mediante buceo apnea, en la localidad de Caleta Piedra Azul, norte de Chile. Su longitud estándar es 33,6 cm y su peso total 960 g. Morfológicamente no hay diferencias con los ejemplares de coloración normal. La coloración general del cuerpo es gris oscura, con bandas verticales levemente más claras en el flanco. Las aletas no presentan en sus extremos la tonalidad anaranjada característica de la especie. Se discute la validez del efecto de una infección por tremátodos como agente causal del melanismo, debido a que es una mutación que ocurre en el receptor de melacortina (MC1R). La condición melánica en *Ch. variegatus*, es muy rara, es la primera vez que se reporta para esta especie, donde la expresión de un color oscuro, sería beneficiosa para ejemplares que habiten fondos con poca vegetación y entre grietas.

Palabras clave: *Cheilodactylus variegatus*, bilagay, peces, melanismo, norte de Chile.

First record of melanism in *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833 (Perciformes, Cheilodactylidae)

ABSTRACT. Melanism in fish is rare; it is expressed in a greater number of limnetic species rather than marine. The capture of a *Cheilodactylus variegatus* female specimen with full melanosis is reported. The individual was captured with harpoon by apnea diving, in the Caleta Piedra Azul, northern Chile. Its standard length was 33.6 cm and a total weight of 960 g. There is no morphological difference if compared with normal color specimens. The general coloration of the body is dark gray, with slightly lighter vertical stripes on the flank. No fins show the orange hue characteristic of the species. The validity of trematode infection effect as a causal agent of melanosis is discussed, because it is a mutation in the melanocortin receptor (MC1R). The melanosis condition in *Ch. variegatus*, is very rare. It is the first time that this phenomenon is reported for this species, where the expression of a dark color, would be beneficial to specimens who reside on bottoms with little vegetation and among crevices.

Keywords: *Cheilodactylus variegatus*, morwongs, fishes, melanism, northern Chile.

Cada especie de pez posee un patrón de coloración propia, que les permite ocultarse y mimetizarse en el ambiente, además de dar señales de advertencia y presencia, tanto para sus predadores, como para el sexo opuesto (Lagler, 1975; Bond, 1996).

La manifestación de una coloración anómala se expresa en baja proporción y es reconocida en diferentes expresiones como melanismo, albinismo, leucismo o ambicoloración (Venizelos & Benetti, 1999; Carnikián *et al*., 2006; Simon *et al*., 2009; Mansur, 2011; Veena *et al*., 2011; Mutto *et al*., 2013).

El melanismo es la presencia de un exceso de pigmentación oscura en un animal, que causa una coloración de ennegrecimiento de la piel, de manera total o parcial, situación que no sólo se manifiesta en peces, sino también en otros vertebrados (Alpízar-Trejos,

Corresponding editor: Guido Plaza

Tabla 1. Especies de peces en que se ha reportado melanosis.

Orden	Familia	Especie	Referencias
Lepisosteiformes	Lepisosteidae	*Lepisisteus osseus*	Golff (1935); Woolcott & Kirk (1976); Pigg (1998)
Acipenseriformes	Polyodontidae	*Polyodon spathula*	Marcoux (1966)
Cyprinodontiformes	Fundulidae	*Fundulus heteroclitus*	Parker (1925)
	Poeciliidae	*Gambusia affinis*	Regan (1961)
		Gambusia holbrooki	Hort (2003)
		Girardinus microdactylus	Ponce de León & Rodríguez (2010)
		Girardinus denticulatus	Ponce de León & Rodríguez (2010)
	Cyprinidae	*Siphateles bicolor*	Henkanaththegedara & Stockwell (2011)
Gasterostiformes	Gasterosteidea	*Gasterosteus aculeatus*	Bell (1982)
Gadiformes	Moridae	*Lepidion guentheri*	Bañon *et al*. (2010)
Scorpaeniformes	Liparidae	*Elassodiscus tremebundus*	Orlov (2001a)
		Careproctus cyclocephalus	
	Scorpaenidae	*Sebastolobus macrochir*	Orlov (2001b)
Perciformes	Epinephelidae	*Cephalopholis fulva*	Simon *et al*. (2009); Simon *et al.* (2011)
	Letthrinidae	*Lethrinus nebulosus.*	Jawad *et al*. (2013)
	Pomacanthidae	*Holacanthus tricolor*	Colin (1982)

2012; Barrul & Mate, 2012; Martines-Freira *et al*., 2012; Estrada & Juárez, 2013). En peces, la melanosis ha sido reportada en pocas especies (Tabla 1), lo que indica que no es un aspecto común y que afecta con más frecuencia a especies límnicas.

La captura de un ejemplar de *Cheilodactylus variegatus* (Cheilodactylidae) (bilagai, bilagay, pintadilla, morwongs) constituye el primer registro de un caso de melanosis para esta especie y se espera contribuir al conocimiento sobre su variabilidad intraespecífica.

Esta especie se distribuye desde Paita, Perú hasta Bahía Metri en las cercanías de Puerto Montt, Chile (Chrichigno & Velez, 1998; Vargas & Pequeño, 2001). Se caracteriza por un cuerpo oblongo, comprimido y de dorso elevado, se agrupa en pequeños cardúmenes en las inmediaciones de praderas de macroalgas (Moreno & Flores, 2002; Perez-Matus *et al*., 2007). Es un carnívoro que se alimenta de invertebrados diversos, con predominancia de anfípodos, gasterópodos y porcelánidos (Vargas *et al*., 1999; Moreno & Flores, 2002; Palma & Ojeda, 2002; Medina *et al*., 2004). Los juveniles difieren de los adultos en que tienen un cuerpo muy comprimido y profundo, los ojos más grandes, un patrón de color diferente y viven cerca de la superficie (Nielsen, 1963).

El ejemplar melánico de *Ch. variegatus*, fue capturado con arpón mediante buceo apnea, en la localidad de Caleta Piedra Azul (28°57,54'S; 71°54,05'W) ubicada 15 km al norte de Carrizal Bajo, norte de Chile. Para el reconocimiento y caracterización morfológica se utilizó el trabajo de De Buen (1959) y se registraron los caracteres merísticos y morfométricos propuestos por Pequeño (2001). Dicho ejemplar quedó incorporado en la Sala de Colecciones Biológicas de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Católica del Norte, bajo el registro SCBUCN 3814.

El ambiente donde se encontró el ejemplar capturado, se caracteriza por un sustrato mixto, compuesto por una pradera de *Lessonia trabeculata* (huiro de palo), bloques de piedras blanqueadas (Fig. 1) y grietas. En este caso el individuo capturado se encontraba en una grieta cuya parte superior estaba cubierta por algas.

El ejemplar melánico es una hembra de 33,6 cm de longitud estándar, 39 cm de horquilla (Lh) y 960 g de peso total (Pt). La coloración general es gris oscura, con bandas verticales un poco más claras en los flancos del cuerpo (Fig. 2). Las aletas, pectorales, pélvicas, anal y caudal, no presentan la característica coloración anaranjada del borde posterior. No se visualizan anomalías en la estructura del cuerpo y tampoco en la morfología de las aletas, a excepción de la aleta caudal, que presenta una proporción distinta entre el lóbulo superior e inferior (Fig. 3). Los caracteres merísticos (Tabla 2) y las proporciones morfométricas (Tablas 3, 4) se encuentran dentro del rango descrito para la especie y no difieren de los indicados por Pequeño (2001). Los órganos internos, no presentan anomalías en su morfología, disposición, ni presencia de parásitos. El estado de madurez gonadal de acuerdo a la descripción propuesta por González (2012), es un madu-

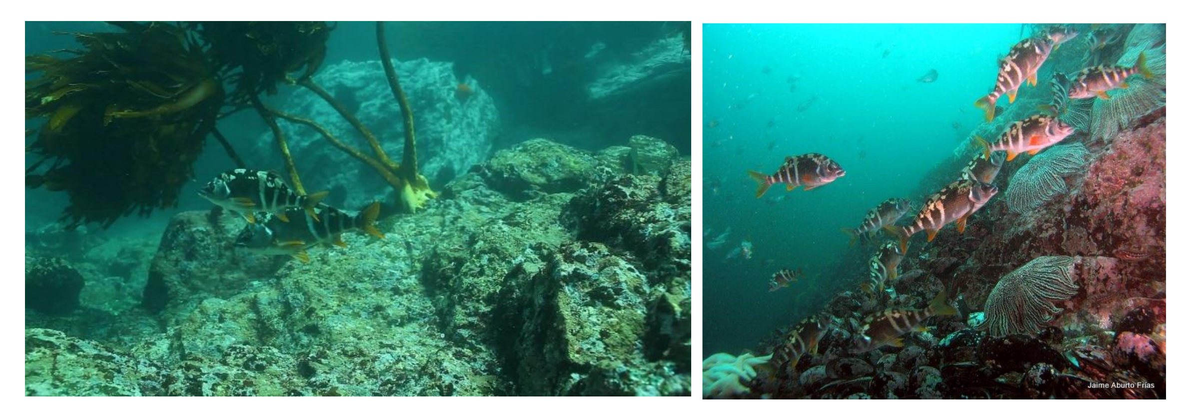


Figura 1. Ambiente donde se capturó un ejemplar de *Cheilodactylus variegatus* con melanosis.



Figura 2. *Cheilodactylus variegatus*. Izquierda individuo con coloración normal, derecha ejemplar con melanosis.

rante medio (IV), con presencia de ovocitos formados, opacos y firmemente unidos por tejido ovárico. El tamaño medio de los ovocitos fue de 0,44 ± 0,08 mm.

Los registros de melanosis en peces, dejan de manifiesto que puede ser de carácter parcial o total, cuyo origen no se conoce con exactitud, donde el parasitismo y las alteraciones genéticas se han sugerido como las causas más probables (Landa *et al*., 1998).

En el caso de melanosis parcial, se tiene registro en Gadiformes, *Gadus callarías* y *Merlangius merlangus*, cuya causa sería el alto número de parásitos tremátodos y la reacción intensa del huésped en el desarrollo de sus melanóforos, junto a una hipertrofia de su dermis (Gamble & Drew, 1911; Hsiao, 1941). También se ha reportado la presencia de híbridos intergenéricos (Elwin, 1957) y machos con coloración nupcial melánica (Regan, 1961; Bell, 1982; Bisazza & Pilastro, 2000; Hort, 2003).

Estudios recientes, explican que la melanosis está relacionada con el funcionamiento del sistema de melanocortinas, que corresponden a un grupo de hormonas peptídicas que incluye a la adenocorticotrofina (ACTH) y a las distintas formas de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH), además de cinco subtipos de receptores de melanocortinas (Metz *et al*., 2006; Takahashi & Kawauchi, 2006; Selz *et al*., 2007). En peces, la melanosis se produciría por acción del gen del receptor de melacortina (MC1R) que permite que una proteína de membrana, se acople a una proteína G presente en los melanocitos y actúe como un interruptor que controla el tipo de melanina que va a ser sintetizada: eumelanina, que produce colores obscuros (negro o pardo) o feomelanina, que produce colores más claros (rojo o amarillo). En mamíferos y aves, la coloración del cuerpo es producida por la interacción de los dos tipos de melanina; mientras que en peces y reptiles no hay producción de feomelanina, por lo que se considera que en estos grupos el MC1R está relacionado con la densidad, más que con el tipo de melanina producida (Manríquez & Hernández, 2012). Estos fundamentos permiten rechazar la hipótesis que la infección por tremátodos es la causa de la melanosis reportada en *Gadus callarias* y en *Merlangius merlangus* (Gamble & Drew, 1911; Hsiao, 1941).

Simon *et al*. (2009, 2011) señalan un caso de melanosis parcial en *Cephalopholis fulva* (Epinephelidae), donde explican que este patrón de coloración, podría tener impacto en las relaciones so-

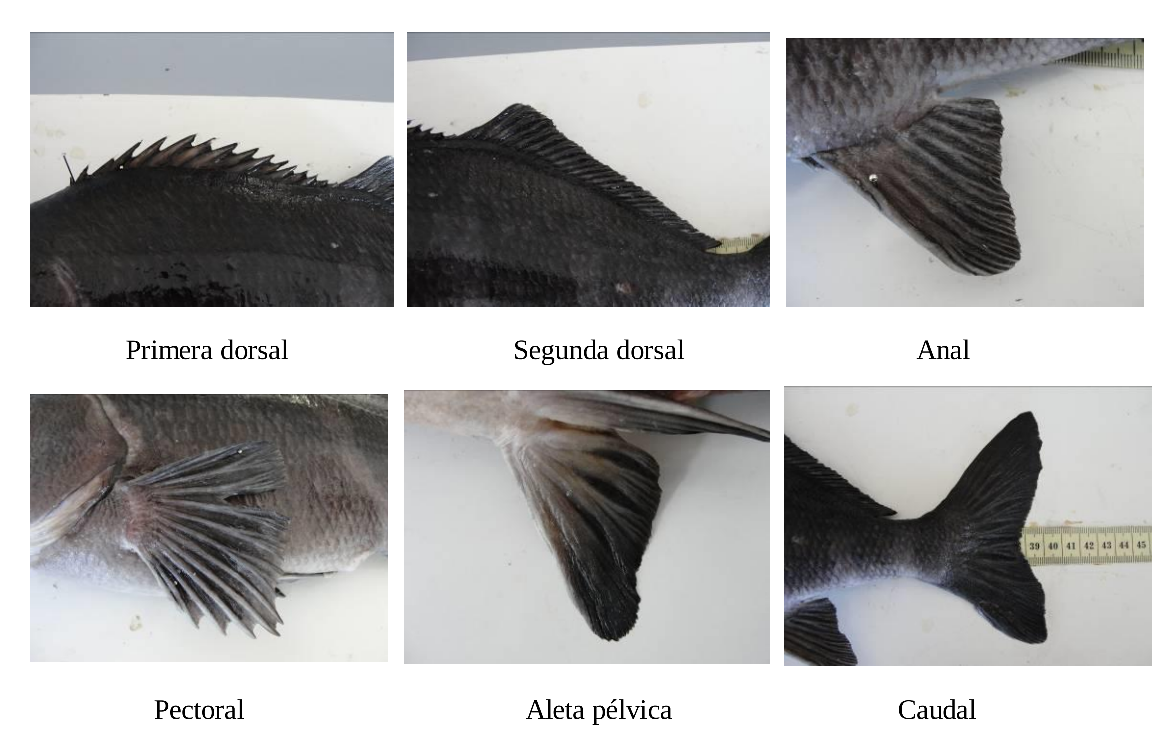


Figura 3. Morfología de las aletas del ejemplar de *Cheilodactylus variegatus* con melanosis.

Tabla 2. Caracteres merísticos del ejemplar de *Cheilodactylus variegatus* con melanosis.

Caracteres merísticos	Presente estudio	Pequeño (2011)
Espina primera dorsal	16	14-16
Radio segunda aleta dorsal	29	28-30
Elemento aleta anal	III+ 8-10	III+8+10
Radio aleta pectoral	14	14-15
Radio aleta caudal	8	
Branquispinas brazo inferior del 1er arco	15	14-15

ciales y en el éxito reproductivo. Interpretación que se fundamenta en que *C. fulva* es una especie protogínica, donde los machos defienden un territorio y conforman un harem (Heemstra & Randall, 1993). La condición melánica rompería el patrón habitual de coloración y podría afectar la relación social, porque es probable que un género no reconozca al otro.

El ejemplar melánico de *Ch. variegatus* tiene un melanismo total, que incluye cuerpo y aletas, donde la causa más probable a este patrón de coloración sea genética, asociado al sistema de melanocortinas. El patrón normal le permite a esta especie tener una coloración críptica disruptiva, por la presencia de bandas verticales claras sobre un fondo corporal café y

Tabla 3. Relaciones morfométricas respecto de la longitud estándar, en el ejemplar de *Cheilodactylus variegatus* con melanosis.

Relación morfométrica	%
Longitud de la cabeza	34,6
Distancia predorsal	31,5
Distancia preanal	69,6
Altura máxima del cuerpo	39,6
Longitud base primera aleta dorsal	33,9
Longitud base segunda aleta dorsal	34,0
Longitud base aleta anal	11,9
Longitud aleta pectoral	22,6
Longitud aleta pélvica	16,5
Altura mínima pedúnculo caudal	8,1
Diámetro orbital	6,2
Distancia interorbital	8,9
Distancia preocular	11,0

aletas anaranjadas, pasando desapercibido para sus predadores, ya sea bajo el dosel de algas y/o contra el fondo blanqueado. Entre sus predadores se tiene a *Lontra felina* (Córdova *et al.*, 2009) y probablemente a *Squalus acanthias* y *Otaria flavescens*, debido a que estas especie en la zona sur de Argentina predan sobre *Cheilodactylus bergi* (García & Sánchez, 1997; Romero *et al.*, 2011). En *Ch. variegatus* la expresión de un color oscuro, se vería favorecida en ejemplares que

Tabla 4. Relaciones morfométricas respecto de la longitud de la cabeza, en el ejemplar con melanosis de *Cheilodactylus variegatus*.

Relación morfométrica	%
Longitud base aleta anal	34,4
Longitud aleta pectoral	65,3
Longitud aleta pélvica	47,8
Altura mínima pedúnculo caudal	23,4
Diámetro orbital	17,9
Diámetro interorbital	25,8
Diámetro preocular	31,8

habitan fondos con escasa vegetación y entre grietas, donde la extracción de algas podría tener un impacto positivo en la frecuencia de estos ejemplares.

La talla de primera madurez reproductiva en esta especie, ha sido estimada para ejemplares de Perú en 20,5 cm Lh (Samamé *et al*., 1995) y un análisis entre el 2002 y 2010, fue determinada en 18 cm Lt y ocurriría a los dos años de vida (González, 2012). En Chile, esta talla fue estimada en 26,7 y 30,6 cm Lt en hembras y machos respectivamente (González-But *et al*., 2012). El ejemplar melánico (33,6 cm Lh), tiene un tamaño superior al de primera madurez y tendría una edad entre 5 y 6 años. Antecedente que junto al grado de madurez observado, se puede inferir que al menos este ejemplar podría haberse reproducido.

Se agradece al Dr. Jaime Aburto por una de las imágenes que muestra el ambiente donde habita *Ch. variegatus*.

REFERENCIAS

Alpízar-Trejos, K. 2012. Melanismo en *Butorides virescens* en la Isla del Coco, Costa Rica. Zeledonia, 16(1): 25-27.

Bañon, R., J.C. Arronte, J. Heredia & J.A. Pis-Millán. 2010. First record of a specimen of *Lepidion guentheri* (Giglioli, 1880) (Gadiformes: Moridae) with melanistic coloration. J. Appl. Ichthyol., 26: 602-605.

Barrul, J. & I. Mate. 2012. Primera cita de gineta (*Genetta genetta* L., 1758) melánica en Cataluña. Galemys, 24: 74-75.

Bell, M. 1982. Melanism in a high elevation population of *Gasterosteus aculeatus*. Copeia, 1982(4): 829-835.

Bisazza, A. & A. Pilastro. 2000. Variation of female preference for male coloration in the eastern mosquitofish *Gambusia holbrooki*. Behav. Genet., 30(3): 207-212.

Bond, C.E. 1996. Biology of fishes. Thomson Learning, Singapur, 750 pp.

Carnikián, A. , A. Acuña & F. Viana. 2006. Ambicolored specimens of the flounder *Paralichthys orbignyanus* (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). Neotrop. Ichthyol., 4(2): 285-286.

Colin, P. 1982. Melanism in the rock beauty, *Holacanthus tricolor*, (Pisces: Pomacanthidae) in Puerto Rico. Bull. Mar. Sci., 32(3): 800-802.

Córdova, O., J. Rau, C.G. Suazo & A. Arriagada. 2009. Estudio comparativo de la ecología alimentaria del depredador de alto nivel trófico *Lontra felina* (Molina, 1782) (Carnivora: Mustelidae) en Chile. Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 44(2): 429-438.

Chirichigno, N. & J. Vélez. 1998. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Inst. Mar Perú, Publicación Especial, Callao, 503 pp.

De Buen, F. 1959. Lampreas, tiburones, rayas y peces en la estación de biología marina de Montemar, Chile (Primera Contribución). Rev. Biol. Mar., 9(1-3): 1-196.

Elwin, M. 1957. Pathological melanosis in an intergeneric hybrid. Nature, 179: 1254-1255.

Estrada, Ch. & A. Juárez. 2013. Relaciones interespecíficas entre jaguar (*Panthera onca*) y el humano en la costa atlántica de Guatemala. Tesis de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 35 pp.

Gamble, F.W. & G.H. Drew. 1911. Note on abnormal pigmentation of a whiting infected by trematode larvae. J. Mar. Biol. Assoc., UK, 9: 243.

García, S. & F. Sánchez, 1997. Alimentación de *Squalus acanthias* y predación sobre *Merluccius hubbsi* en el mar argentino entre 34°47’-47°S. Rev. Invest. Des. Pesq., 11: 119-133.

Golff, C.C. 1935. A case of melanism in *Lepisosteus osseus*. Copeia, 1935(1): 41.

González, A. 2012. Parámetros biológico-pesqueros y talla mínima de captura de *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes. Instituto del Mar del Perú, Informe 39(1-2): 53-60.

González-But, J., F. Balbontín & G. Herrera. 2012. Ciclo reproductivo y talla media de madurez en el bilagay *Cheilodactylus variegatus* (Valenciennes, 1883) del área de Valparaíso. XXXII Congreso de Ciencias del Mar, Punta Arenas, 223 pp.

Heemstra, P.C. & J.E. Randall. 1993. Groupers of the world. FAO Fisheries Synopsis, Rome, 16(125): 382 pp.

Henkanaththegedara, S. & C. Stockwell. 2011. Melanism in endangered Mohave tui chub *Siphateles bicolor mohavensis* Snyder, 1918 (Cypriniformes: Cyprinidae). West. N. Am. Natur., 71(1): 127-130.

Hort, L. 2003. Melanic body colour and aggressive mating behavior are correlated traits in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). Proc. R. Soc. Lond., 270: 1033-1040.

Hsiao, S. 1941. Melanosis in the common cod, *Gadus callarias* L., associated with trematode infection. Biol. Bull., 80(1): 37-44.

Jawad, L., S. Al-Shogebai & J.M. Al-Mamry. 2013. A reported case of malpigmentation in the spangled emperor *Lethrinus nebulosus* (Osteichthyes: Lethrinidae) collected from the Arabian Sea coasts of Oman. Thalassia Salentina, 35: 29-35.

Lagler, K.F., J.W. Bardach & R. Miller. 1962. Ichthyology. John Wiley & Sons, New York, 545 pp.

Landa, J., P. Pereda & J. Barrado. 1998. Presencia de caracteres atípicos en dos ejemplares de rape *Lophius budegassa* Spinola, 1807 capturados en el mar Cantábrico. Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 14: 123-129.

Manríquez, N.L.M. & J.C. Hernández. 2012. Evolución de los patrones de coloración en escamados. Herreriana, 8(1): 10-12.

Mansur, L. 2011. First record of partial albinism in the temperate rocky reefs fish *Acanthistius patachonicus* (*Insertae sedis*) off Southwestern Atlantic Ocean. Pan-Am. J. Aquat. Sci., 6(2): 185-187.

Marcoux, R. 1966. Occurrence of a melanistic paddlefish (*Polyodon spathula*) in Montana. Copeia, 1966(4): 876.

Martínes-Freira, F., X. Pardavila & A. Lamosa. 2012. Un nuevo caso de melanismo *Vipera latastei*. Bol. Asoc. Herpetol. Esp., 23(1): 51-54.

Medina, M., M. Araya & C. Vega. 2004. Alimentación y relaciones tróficas de peces costeros de la zona norte de Chile. Invest. Mar., Valparaíso, 32(1): 33-47.

Metz, J.R., J. Peters & G. Flik. 2006. Molecular biology and physiology of the melanocortin system in Wsh: a review. Gen. Comp. Endocr., 148: 150-162.

Moreno, M. & H. Flores 2002. Contenido estomacal de *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes 1833, *Pinguipes chilensis* Valenciennes 1833 y *Prolatilus jugularis* Valenciennes 1833 en Bahía de La Herradura, Coquimbo, durante primavera del 2001. Gayana, 66(2): 213-217.

Mutto, N., T. Noda, Y. Kai & T. Nakabo. 2013. First record of albinism in the rockfish *Sebastes pachycephalus* complex (Scorpaeniformes: Scorpaenidae). Ichthyol. Res., 60: 195-197.

Nielsen, J. 1963. On the development of *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833 (Cheilodactylidae). Copeia, 1963(3): 528-533.

Orlov, A.M. 2001a. Rare events of cyclopia and melanism among deep-water snail fishes (Liparidae, Scorpaeniformes). Oceans, 2: 864-869.

Orlov, A.M. 2001b. The first instance of melanism in the thorny-head *Sebastolobus macrochir* (Scorpaenidae). J. Ichthyol., 41(6): 474-477.

Palma, A. & F.P. Ojeda. 2002. Abundance, distribution, and feeding patterns of a temperate reef fish in subtidal environments of the Chilean coast: the importance of understory algal turf. Rev. Chil. Hist. Nat., 75: 189-200.

Pequeño, G. 2001. El bilagai *Cheilodactylus variegatus* Valenciennes, 1833, en la costa de Valdivia (Osteichthyes: Cheilodactylidae). Estud. Oceanol., 20: 23-28.

Pérez-Matus, A., L.A. Ferry-Graham, A. Cea & J. Vásquez. 2007. Community structure of temperate reef fishes in kelp-dominated subtidal habitats of northern Chile. Mar. Fresh. Res., 58: 1069-1085.

Pigg, J. 1998. Melanism in longnose gar, *Lepisosteus osseus* Linnaeus (Lepisosteidae). Proc. Okla. Acad. Sci., 78: 123-123.

Ponce de León, J.L. & R. Rodríguez. 2010. Peces cubanos de la Familia Poeciliidae. Guía de Campo. Universidad de La Habana, Cuba, Editorial Academia, La Habana, 38 pp.

Regan, J. 1961. Melanism in the poeciliid fish, *Gambusia affinis* (Baird and Girard). Am. Midl. Nat., 65(1): 139-143.

Romero, M.A., S. Dans, R. González, G. Svendsen, N. García & E. Crespo. 2011. Solapamiento trófico entre el lobo marino de un pelo *Otaria flavescens* y la pesquería de arrastre demersal del golfo San Matías, Patagonia, Argentina. Lat. Am. J. Aquat. Res., 39(2): 344-358.

Samané, M., R. Quiroz & T. Machii. 1995. Weight-length relationships and reproduction of the Peruvian pintadilla, *Cheilodactylus variegatus* V. (Cheilodactylidae), from the Callao fishing zone, Peru. Fish. Res., 22: 279-291.

Selz, Y., I. Braasch, C. Hoffmann, C. Schmidt, Ch. Schultheis, M. Schartl & J.N. Volff. 2007. Evolution of melanocortin receptors in teleost fish: the melanocortin type 1 receptor. Gene, 401: 114-122.

Simon, T., J.Ch. Joyeux & R.M. Macieira. 2009. First record of partial melanism in the coney *Cephalopholis fulva* (Perciformes: Epinephelidae). Braz. J. Oceanogr., 57(2): 145-147.

Simon, T., J.Ch. Joyeux & J.L. Gasparini. 2011. Are melanic coney *Cephalopholis fulva* getting common? Mar. Biodivers. Rec., 4: 851.e51 doi: 10.1017/S17552 67211000455.

Takahashi, A. & H. Kawauchi. 2006. Evolution of melanocortin systems in fish. Gen. Comp. Endocr., 148: 85-94.

Vargas, L. & G. Pequeño. 2001. Hallazgo del bilagai (*Cheilodactylus variegatus* Velenciennes, 1833), en la Bahía Metri, Chile (Osteichthyes: Cheilodactylidae). Invest. Mar., Valparaíso, 29(2): 35-37.

Vargas, M., P. Fuentes, P. Hernáez, A. Olivares & P. Rojas. 1999. Relaciones tróficas de cinco peces costeros comunes en el área submareal del norte de Chile (20°11', 20°20'S). Rev. Biol. Trop., 47(3): 601-604.

Veena, S. , S. Thomas, S.G. Raje & R. Durgekar. 2011. Case of leucism in the spadenose shark, *Scoliodon laticaudus* (Müller & Henle, 1838) from Mangalore, Karnataka. Indian J. Fish., 58(1): 109-112.

Venizelos, A. & D. Benetti. 1999. Pigment abnormalities in flatfish. Aquaculture, 176: 181-188.

Woolcott, W. & W. Kirk. 1976. Melanism in *Lepisosteus osseus* from the James River, Virginia. Copeia, 1976(4): 815-817.

Received: 22 September 2014; Accepted: 16 January 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 595-600, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-22

Short Communication

Screening of aflatoxin B_1 and mycobiota related to raw materials and finished feed destined for fish

Etelvina María Carvalho Gonçalves-Nunes[1], Maria M. Gomes-Pereira[1], Amilton P. Raposo-Costa[1] Carlos A. da Rocha-Rosa[2], Carina M. Pereyra[3], Rodrigo M. Calvet[1], Ana L. Alves-Marques[1] Francisco Cardoso-Filho[1] & Maria C. Sanches-Muratori[1]
[1]Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, Piauí 64049-550, Brazil
[2]Departamento de Imunología e Microbiologia Veterinária, Instituto de Veterinária
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 23890-000, Brazil
[3]Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto
Ruta 36 km 601, 5800 Río Cuarto. Córdoba, Argentina
Corresponding author: Etelvina Nunes (etelnunes@yahoo.com.br)

ABSTRACT. The aim of the present study was to determine fungal genera, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* species and aflatoxin B_1 contamination from raw materials and finished feed intended for fish farm localized in Piaui, Brazil. *Aspergillus flavus* and *P. citrinum* were isolated with a high relative density from all samples. In general, a high percent of samples exceeded the levels proposed as feed hygienic quality limits (CFU g^{-1}) according to Good Manufacture Practice. Aflatoxin B_1 was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. All raw materials and finished feed showed aflatoxin B_1 levels. Although in this study AFB_1 levels below recommended limits (20 µg kg^{-1}) were found, it is important to emphasize the feed intake with toxin in low concentrations along time, since it produce chronic deleterious effects in animal production. This fact requires periodic monitoring to prevent the occurrence of chronic aflatoxicosis in aquaculture, to reduce the economic losses and to minimize hazards to animal health.

Keywords: aflatoxin B_1, mycobiota, finished feed fish, raw materials, aquaculture.

Monitoreo de aflatoxina B_1 y micobiota relacionada a materias primas y alimentos terminados destinados a peces

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue determinar géneros fúngicos, especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* y la contaminación de aflatoxina B_1 (AFB_1) en materias primas y alimento terminado destinado a la cría de peces en el estado de Piauí, Brasil. *Aspergillus flavus* y *P. citrinum* fueron aisladas con alta densidad relativa. En general, un alto porcentaje de muestras excedieron los niveles fúngicos propuestos como límite de calidad higiénica (CFU g^{-1}) según las buenas prácticas de manufactura. Aflatoxina B_1 fue analizada por ensayos inmuno-enzimáticos. Todas las materias primas y el alimento terminado mostraron niveles de contaminación con AFB_1. Aunque en este estudio los niveles de AFB_1 estuvieron por debajo del límite recomendado (20 µg de toxina kg^{-1} de alimento), es importante enfatizar la ingesta de alimento con bajas concentraciones de toxina a lo largo del tiempo ya que produce efectos crónicos en animales de producción. Este factor requiere monitoreo periódico para prevenir la incidencia de aflatoxicosis crónica en acuacultura, reducir las pérdidas económicas y minimizar los riesgos de la salud animal.

Palabras clave: Aflatoxina B_1, micobiota, alimento terminado, materia prima, acuicultura.

Aquaculture is currently the fastest growing animal production sector in the world. Brazil obtained the third position in production of aquaculture in America (FAO, 2011; MPA, 2011). This increase in aquaculture production must be supported by a corresponding increase in the production of formulated diets for the cultured aquatic animals. For most aquaculture systems, the cost of feed constitutes 30 to 60% of the farm operational costs (Wing-Keong, 2003). The improvement in the formulation and preparation of diets for fish requires the

Corresponding editor: Patricio Arana

detection of factors that negatively affect the quality of feed, to avoid production losses (Conroy, 2000). Mycotoxins are fungal secondary metabolites associated with severe toxic effects to vertebrates and produced by important fungi including *Aspergillus, Penicillium, Fusarium,* and *Alternaria* species (Kabak *et al*., 2006). Aflatoxins (AFs) are a group of naturally occurring mycotoxins produced by *Aspergillus* fungi, especially *A. flavus* and *A. parasiticus*. Aflatoxin B_1 (AFB_1), in particular, is toxic to many species of animals, as well as humans, and presents carcinogenic, teratogenic and mutagenic potential (IARC 2002, Sassahara *et al*., 2005). There are many reports on the contamination of mycotoxins in various raw materials and feeds for animals (Akande *et al*., 2006; Glenn, 2007; Keller *et al*., 2007; Martin *et al*., 2008; Cavaglieri *et al*., 2009; Pereyra *et al*., 2011). Several reports on evidence of the negative impact of mycotoxins in fish species were informed in the south of Brazil (Lopes *et al*., 2005, 2010; Vieira *et al*., 2006). However, there is no published information on feed contaminated with fungal genera and AFB_1 intended for fish feed in northeast of Brazil. The aim of the present study was to determine fungal genera, *Aspergillus, Penicillium* and *Fusarium* species and AFB_1 contamination from raw materials and finished feed intended for fish.

Raw materials and finished fish feed samples were collected from one industry in Piauí State, Brazil (5º5′20″S, 42°48′7″W). This industry was selected because it is the major provider of feed intended for fish farm in the northeast of Brazil. A total of 18 raw materials and 36 finished fish feed samples (pelleted) were sampled from January to March 2009. To ensure a correct sampling, each bag of 25 kg had a linear imaginary division in its length into three equal parts from which primary samples (1 k) from the upper layer, central layer and lower layer were collected. Three kinds of raw materials: soybean bran, corn bran, and other cereals (wheat meal, fishmeal and meat meal) in small amount intended for feed manufacturing were collected. The composition of the finished feed samples was composed of soybean bran (15%), corn bran (27%), other cereals (57.5%), and vitamin-mineral mix (0.5%). Samples were properly packed in bags and immediately sent to the laboratory. Samples were immediately processed for mycological analyses and kept at -4°C until AFB_1 analyses.

Analysis of the mycobiota was made by the plate dilution spread method onto dichloran rose bengal chloranphenicol agar (DRBC), a general medium used for estimating total mycobiota (Abarca *et al.,* 1994). Quantitative enumeration was done using the surface-spread method. Twenty-five grams of each sample were homogenized in 225 mL 0.1% peptone water solution for 30 min in an orbital shaker. Serial dilutions (10^{-2} to 10^{-3}) were made and 0.1 mL aliquots were inoculated in duplicates onto the culture media. Plates were incubated at 25ºC for 7 days in darkness. Only plates containing 10-100 colony-forming units (CFU) were used for counting. The results were expressed as CFU g^{-1} per sample. Representative colonies of *Aspergillus* and *Penicillium* were transferred for sub-culturing to tubes containing malt extract agar (MEA) whereas *Fusarium* spp. were transferred for sub-culturing to plates containing carnation leaf agar (CLA). Species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* were identified according to Klich (2002); Samson *et al*. (2000); and Nelson *et al*. (1983), respectively. The results were expressed as isolation frequency (% of samples in which each genera was present) and relative density (% of isolation of each species among strains of the same genera).

A commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate *Kit* AgraQuant® Total Aflatoxin Assay (Romer Labs®) was applied for the extraction and quantification of AFB_1. A 20 g portion of each sample was extracted with 100 mL methanol during 3 min into a blend jar. The mixture was diluted in water (1:20 v v^{-1}) and an aliquot taken and placed into a culture plate. Detection limit of the technique was 1.0 µg kg^{-1} (ppb) for AFB_1.

Data analyses were performed by analysis of variance. Total fungal counts data were transformed using a logarithmical function log_{10} (x+1) before applying the analysis of variance. The Student-Newman-Keuls (SNK) test was used to determine the significant differences between means. The analysis was conducted using SIGMA STAT program.

Table 1 show the fungal counts from raw materials and finished fish feed in DRBC culture media. In general, a high percent of raw materials and finished feed samples had counts higher than $1x10^4$ CFU g^{-1}.

A mycological survey of the samples indicated the presence of nine genera of filamentous fungi (Table 2). Table 3 shows the relative density of isolated of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., and *Fusarium* spp. isolated from raw materials and finished fish feed. *Aspergillus flavus* and *P. citrinum* were isolated with a high relative density from all raw materials and finished fish feed. *Aspergillus parasiticus* was isolated from all raw materials but not of finished fish feed. *Aspergillus section nigri* (*A. carbonarius* and *A. niger* aggregate) strains were isolated of soybean bran and other cereals with a relative density from 23.1 and 16.7%, respectively. *Aspergillus versicolor, A. fumigatus* and *A. terreus* strains were isolated at lower relative densities. *Penicillium pinophylum* was isolated only in corn bran with a relative density of 35% and *P. funicu-*

Table 1. Fungal counts (CFU g^{-1}) from raw materials and finished fish feed in DRBC culture media. DRBC: dichloran rose bengal chloranphenicol, detection limit: $1x10^2$ CFU g^{-1}, maximum recommended level: $1x10^4$ CFU g^{-1} (GMP, 2008). (*) % samples exceeded the maximum recommended level, a = the same letters represent similar results ($P > 0.05\%$).

Samples		Fungal counts (CFU g^{-1}) Media-range	Samples over limits (%)*
Raw materials samples	Soybean bran	$3.23x10^{4\,a}$ ($9.33x10^3$ - $5.62x10^4$)	83.3
	Corn bran	$6.92 \times 10^{4\,a}$ ($1.55x10^4$ - $2.45x10^5$)	100
	Other cereals	$3.72 \times 10^{3\,b}$ (<$1.0x10^2$ - $3.47x10^4$)	66.7
Finished feed samples		$2.40 \times 10^{4\,a}$ ($4.47x10^3$ - $1,02x10^5$)	66.7

Table 2. Isolation frequency of fungal genera (%) from raw materials and finished fish feed.

Fungal genera	Isolation frequency (%)			
	Raw materials samples			Finished feed samples
	Soybean bran	Corn bran	Other cereals	
Penicillium sp.	100	100	66.7	83.3
Aspergillus sp.	83.3	66.7	66.7	66.7
Fusarium sp.	0	16.7	0	0
Cladosporium sp.	0	0	0	20
Paecilomyces sp.	16.7	0	0	0
Acremonium sp.	0	16.7	0	0
Byssochlamys sp.	16.7	0	0	0
Geotrichum sp.	0	0	16.7	0
Rizhopus sp.	16.7	16.7	16.7	23.3

losum was present in the soybean bran and corn bran. *Penicillium purpurogenum, P. corylophilum, P. miczynskii, P. implicatum* and *P. variable* strains were isolated at lower relative densities. *Fusarium verticillioides* was only present in corn bran.

Table 4 show the AFB_1 levels in raw materials and finished fish feed. Aflatoxin B_1 was detected in mean levels of 5.8 µg kg^{-1} (soybean bran), 1.1 µg kg^{-1} (corn bran), 7.4 µg kg^{-1} (other cereals) and 3.8 µg kg^{-1} (finished fish feed) with a frequency from 40, 33.3, 60 and 16.7%, respectively.

Fungi and AFB_1 contamination from raw materials and finished feed intended for fish farm were studied.

The quality of food is an essential prerequisite for obtaining optimal production results in fish production (Jakic-Domic *et al*., 2005). Fungal growth leads to reduction of the nutritional quality of the raw materials, and may contribute to the contamination of the finished fish feed by fungi (Cavaglieri *et al*., 2009). In this study, a high mycological contamination in raw materials and finished feed was found. The collected soybean bran (83.3%), corn bran (100%), other cereals (66.7%) and finished fish feed (66.7%) samples exceeded the limit $1x10^4$ CFU g^{-1} that determines feed hygienic quality, according to good manufacturing practices (GMP, 2008). These results suggest a high fungal activity that could affect the palatability of feed and reduce the animal nutrients absorption, determining a low quality substrate (Ogundero, 1987; Martins & Martins, 2001). The screening of samples for fungal propagules is a useful exercise in itself as an indicator of contamination but also complements the analysis of mycotoxins that could be present.

High fungal diversity was found in raw materials and finished fish feed. All samples showed that *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., the main toxigenic fungus, were the prevalent genera. Many studies have shown that most feed have species of *Aspergillus* and *Penicillium* genera as predominant in pelleted or extruded feed (Keller *et al*., 2007, 2008; Fernandez-Juri *et al*., 2009; Pereyra *et al*., 2009). Our results are similar to those obtained by Santos (2006) and Calvet (2008) in marine shrimp and Cardoso (2011) in finished fish feed samples. However, these authors did not analyze the raw materials.

Table 3. Relative density (%) of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., and *Fusarium* spp. isolated from raw materials and finished fish feed.

Species	Relative density (%)			
	Raw materials samples			Finished feed samples
	Soybean bran	Corn bran	Other cereals	
A. flavus	61.5	50	66.6	100
A. parasiticus	7.7	25	16.7	0
A. versicolor	7.7	8.3	0	0
A. fumigates	0	8.3	0	0
A. terreus	0	8.3	0	0
A. carbonarius	7.7	0	16.7	0
A. niger aggregate	15.4	0	0	0
P. citrinum	81.8	35	90.9	94.1
P. purpurogenum	0	0	0	5.9
P. pinophylum	0	35	0	0
P. funiculosum	9.1	20	0	0
P. corylophilum	0	0	9.1	0
P. miczynskii	0	5	0	0
P. implicatum	0	5	0	0
P. variabile	9.1	0	0	0
F. verticillioides	0	100	0	0

Table 4. Aflatoxin B_1 levels in raw materials and finished fish feed. [†]Contamination frequency (%): percentage of samples contaminated with AFB_1.

Mycotoxins		Raw material samples			Finished feed samples
		Soybean bran	Corn bran	Other cereals	
AFB_1	Media ± range (μg kg^{-1})	5.8 (1.3-10.3)	1.1 (1.0-1.7)	7.4 (1.5-19.1)	3.8 (1.6-9.8)
	Frequency[†] (%)	40	33.3	60	16.7

In this study, a high frequency of *Aspergillus* species was found. *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* were the predominant species isolated. This species are important aflatoxins producers, mainly AFB_1 (CAST, 2003). Santos (2006), Calvet (2008) and Cardoso (2011) reported high percentages of *A. flavus* in feed samples from aquaculture in northeast of Brazil. Other studies found *Aspergillus* section *Flavi* species from equine, poultry and pet-pelleted feed samples as prevalent (Keller *et al*., 2007; Fernandez-Juri *et al*., 2009; Pereyra *et al*., 2009). Many of the *Penicillium* species found (*P. citrinum, P. purpurogenum, P. pinophylum, P. funiculosum, P. corylofhilum, P. miczynskii, P. implicatum* and *P. variabile*), can produce a very wide range of toxic compounds such as citrinin and cetroeviridin (Pitt, 2004). So far, there is no information about the toxicological effects of these mycotoxins in fish. In this study, *F. verticillioides* was found only in corn bran. Other authors reported *Fusarium* species in marine shrimp and fish feed samples (Santos, 2006; Cardoso, 2011). *Fusarium* is a genus of field; these species do not have the ability to grow in dry feed such as pelleted and extruded feed.

All raw materials and finished feed showed aflatoxin B_1 levels. This result agrees with those obtained by Hashimoto *et al*. (2003) in feed used for aquaculture in the region of Londrina, Paraná, which was 28.5% of total aflatoxins contaminated samples, being AFB_1 the principal. In other study of commercial feeds for fish in the north and west of the State of Parana, Buck (2005) detected total aflatoxins contamination in 17% of samples with levels of 7.84 to 26.49 μg kg^{-1}.

The biological effects of mycotoxins depend on the ingested amounts, number of occurring mycotoxins, and time of exposure and animal sensitivity. Moreover, the mycotoxin effects are not only amplified by stress production but also high in intensively reared animals (Yiannikouris & Jouany, 2002; Binder, 2007). Although

in this study AFB_1 levels below recommended limits (20 µg kg^{-1}, GMP, 2008) were found, it is important to emphasize the feed intake with toxin in low concentrations along the time since produce chronic deleterious effects in animal production. El-Sayed & Khalil (2009) described that a prolonged feeding of European seabass with low levels of AFB_1 (1.8 µg kg^{-1} body weight) causes not only serious health problems in exposed-fish, but also represents a high risk to consumers through AFB_1 residues in fish musculature. This might also pose human health concerns as certain aflatoxin levels were recorded in the muscles of fish fed contaminated diets. Han *et al*. (2009) described that gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (L.) fed with more than 10 µg AFB_1 kg^{-1} diet showed accumulation of AFB_1 residues in muscles and ovaries above the safety limitation of European Union (2 ppb).

It is very difficult to guarantee the absence of mycotoxins in aquaculture feeds even when appropriate measures are taken, such as good screening programs, selection of high quality raw materials and feed ingredients, and good storage conditions. It is therefore imperative to find effective ways of managing the risks posed by mycotoxin contamination.

This is the first report that provides information on the fungal and AFB_1 contamination in raw materials and finished feed intended for fish farm localized in Piauí, Brazil. Future studies could be conducted to analyze other mycotoxins, as fuminisins and citrinin.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out with grants from CAPES, Brazil. The authors thanks Alverne Barbosa for his assistance in getting the fish feed samples.

REFERENCES

Abarca, M.L., M.R. Bragulat, G. Castellá & F.J. Cabañes. 1994. Ochratoxin a production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Appl. Environ. Microbiol., 60: 2650-2652.

Akande, K.E., M.M. Abubakar, T.A. Adegbola & S.E. Bogoro. 2006. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: a review. Pakistan J. Nutr., 5: 398-403.

Binder, E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Anim. Feed Sci. Technol., 133: 149-166.

Buck, E.L. 2005. Micotoxinas em ração comercial para peixes. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 44 pp.

Calvet, R.M. 2008. Isolamento e identificação de fungos toxígenos em carcinicultura marinha. 83 pp. (Dissertação). Universidade Federal do Piauí. [http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ciencianimal/arquivos/files/DM_RMC.pdf]. Reviewed: 10 January 2014.

Cardoso, F.C. Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil. 2011. 43 pp. (Dissertação) Universidade Federal do Piauí. [http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ciencianimal/arquivos/files/FRANCISCO.pdf]. Reviewed: 12 March 2014.

Cavaglieri, L.R., K.M. Keller, C.M. Pereyra, M.L. González-Pereyra, V.A. Alonso, F.G. Rojo, A.M. Dalcero & C.A.R. Rosa. 2009. Mycotoxicity of barley rootlets and malt used as pig feedstuff ingredients. J. Stored Prod. Res., 4:147-150.

Conroy, G. 2000. Alteraciones asociadas con dos alimentos comerciales en tetrahibridos de tilapia roja cultivados en Venezuela. Associacion Americana de Soya, Boletin Informativo, Caracas, 33 pp.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report Nº139, Ames, Iowa, 199 pp.

El-Sayed, Y.S. & R.H. Khalil. 2009. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B_1 in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Food Chem. Toxicol., 47: 1606-1609.

Fernández-Júri, M.G., A.L. Astoreca, C.L. Barberis, L.R. Cavaglieri, A.M. Dalcero & C.E. Magnoli. 2009. Aflatoxins, fumonisins and toxigenic fungi in raw materials and ready dry dog food in central Argentina. Rev. Bras. Med. Vet., 31: 109-117.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2011. World aquaculture production by culture environment. [http://www.fao.org/fishery/statistics/es]. Reviewed: 20 October 2013.

Glenn, A.E. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. Anim. Feed Sci. Technol., 137: 213-240.

Good Manufacturing Practices (GMP). 2008. GMP Certification scheme animal feed. Sector 2006, Appendix 1: product standards; regulations on product standards in the animal feed Sector. GMP14: 1-39.

Han, D., S. Xie, X. Zhu, Y. Yang & Z. Guo. 2009. Growth and hepatopancreas performances of gibel carp fed diets containing low levels of aflatoxin B_1. Aquacult. Nutr., 16: 335-342.

Hashimoto, E.H., M.A. Santos, E.Y. Ono, C. Hayashi, A.P. Bracarense & E.Y. Hirooka. 2003. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Paraná, Brasil. Semina: Ciênc. Agr., 24: 123-132.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2002. Some traditional herbal medicines, some

mycotoxins, naphthalene and styrene. Monographs, Lyon, 82: 301-366.

Jakic-Dimic, D., S. Jeremic, K. Nesic & V. Radosavljevic. 2005. The influence of mycotoxins in food on fish health status. The first scientific meeting mycology, mycotoxicology and mycoses held from April 2005. Novi Sad., (109): 73-79.

Kabak, B., A.D. Dobson & I. Var. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Critical Rev. Food Sci. Nutr., 46: 593-619.

Keller, K.M., L.A.M. Keller, A.A. Oliveira, T.X. Almeida, R.S. Garcia & C.A.R. Rosa. 2008. Mycotoxicological evaluation of feedstuffs intended for dairy goats in Teresópolis, RJ, Brazil. Rev. Bras. Med. Vet., 30: 91-96.

Keller, K.M., B.D. Queiroz, L.A.M. Keller, J.M.M. Ribeiro, L.R. Cavaglieri, M.L. González- Pereyra, A.M. Dalcero & C.A.R. Rosa. 2007. The mycobiota and toxicity of equine feed. Vet. Res. Comm., 31: 1037-1045.

Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. CBS, Utrecht, 116 pp.

Lopes, P., J. Neto, C. Mallmann, R. Lazzari, F. Pedron & C.A. Veiverberg. 2005. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. Pesq. Agropec. Bras., 40: 1029-1034.

Lopes, P., J.L. Pouey, D.B. Enke, S. Camargo, G. Correa, C.L. Ribeiro, C.A, Mallmann, M.K. Portleninha, M.F. Santiago & M. Soquetta. 2010. Aflatoxin effects on erythrocytic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Rev. FZVA, Uruguaiana, 17: 1-13.

Martins, H.M., M. Marques, I. Almeida, M.M. Guerra & F. Bernardo. 2008. Mycotoxins in feedstuffs in Portugal: an overview. Mycotoxin Res., 1: 19-23.

Martins, H.M. & M.L. Martins. 2001. Mycological quality evaluation of bovine feedstuffs (Portugal: 1996-1999). Rev. Port. Ciênc. Vet., 96: 85-88.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasília, DF, Brazil.[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf]. Reviewed: 12 October 2013.

Received: 20 May 2014; Accepted: 26 February 2015

Nelson, P.E., T.A. Toussoun & W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 193 pp.

Ogundero, V.W. 1987 Toxigenic fungi and the deterioration of Nigerian poultry feeds. Mycopathologia, 100: 75-83.

Pereyra, C.M., L.R. Cavaglieri, S.M. Chiacchiera & A.M. Dalcero. 2011. Mycobiota and mycotoxins contamination in raw materials and finished feed intended for fattening pigs production in eastern Argentina. Vet. Res. Comm., 35: 367-379.

Pereyra, C., G. Pena, L. Cavaglieri, C.D. Krüger, K.M. Keller, C.A.R. Rosa, S.M. Chiacchiera & A.M. Dalcero. 2009. Influence of poultry feed processing on mycobiota and ochratoxin and citrinin co-occurrence. Rev. Bras. Med. Vet., 31: 51-58.

Pitt, J.I. 2004. Guía de laboratorio para la identificación de especies comunes de *Penicillium*. CSIRO Division of Food Processing, Australia, 199 pp.

Samson, R.A., E.S. Hockstra, J.C. Frisvad & O. Filtenborg. 2000. Introduction to food and airborne fungi. Centraalbureau vor Schimmelcultures, Utrecht, 389 pp.

Santos, F.C.F. Fungos em rações para camarões para camarões cultivados no Estado do Piauí. 2006. 53 pp. (Dissertação). Universidade Federal do Piauí. [http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ciencianimal/arquivos/files/DM_FCFS.pdf]. Reviewed: 10 March 2014.

Sassahara, M., N.D. Pontes & E.K. Yanaka. 2005. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M_1 in raw milk in the North of Parana State. Food Chem. Toxicol., 43: 981-984.

Vieira, V., J. Neto, P.R.S. Lopes, R. Lazzari, M.B. Fonseca & C.C. Menezes. 2006. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. Ciênc. Anim. Bras. Goiânia, 7: 49-55.

Wing-Keong, N.G. 2003. The potential use of palm kernel meal in aquaculture feeds. Aquacult. Asia, 8(1): 38-39.

Yiannikouris, A. & J.P. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Anim. Res., 51: 81-99.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 601-606, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-23

Short Communication

Use of probiotics *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Bacillus subtilis* C-3102 in the diet of juvenile Nile tilapia cultured in cages

Nilton Garcia-Marengoni[1], Milton Cézar de Moura[2], Newton Tavares Escocard de Oliveira[1]
Robie Allan Bombardelli[3] & Daniele Menezes-Albuquerque[4]
[1]Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Pernambuco 1777, 85960-000
Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil
[2]Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil
[3]Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil
[4]Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil
Corresponding author: Nilton Garcia Marengoni (nmarengoni@hotmail.com)

ABSTRACT. This study aimed to evaluate gut colonization by probiotic bacteria, and their influence on the bacterial microflora, hematological profile, growth rate and proximate composition, and water quality parameters in the cultivation of Nile tilapia juveniles of the Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT) strain. 1800 fry were randomly distributed into four experimental groups (T_1 = basal diet (BD) without probiotic addition; T_2 = BD + 0.5% *Bacillus cereus* var. *toyoi* (BC); T_3 = BD + 0.5% *B. subtilis* C-3102 (BS); T_4 = BD + 0.25% BC + 0.25% BS) with five replicates. Cages (0.175 m^3 capacity) containing 90 tilapia fry (0.34 ± 0.06 g) were used as culture units and individually installed in 8.4 m^3 ponds. Except for hemoglobin, hematocrit, glucose, and neutrophil levels, no differences in hematological profile were observed among the groups after 127 days of culture ($P > 0.05$). The probiotic bacteria either added individually or in combination, successfully colonized the intestines of the fish, without negatively influencing the intestinal bacterial microflora, growth rate, proximate composition, or water quality parameters ($P > 0.05$). Thus, dietary probiotic supplementation of juvenile Nile tilapia alters the hematological profile, especially hemoglobin, hematocrit, glucose, and neutrophil levels.

Keywords: hematological profile, tilapia, intestinal microflora, probiotics, growth, aquaculture.

Uso de los probióticos *Bacillus cereus* var. *toyoi* y *Bacillus subtilis* C-3102 en la dieta de juveniles de tilapia del Nilo cultivada en jaulas

RESUMEN. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la colonización por bacterias probióticas del intestino y su influencia en la microflora bacteriana, perfil hematológico, tasa de crecimiento, composición proximal, y los parámetros de calidad del agua en el cultivo de juveniles de tilapia del Nilo de la cepa Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT). 1.800 alevines fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (T_1 = dieta basal (BD) sin adición de probióticos; T_2 = BD + 0,5% *B. cereus* var. *toyoi* (BC); T_3 = BD + 0,5% *B. subtilis* C-3102 (BS); T_4 = BD + 0,25% BC + 0,25% BS) con cinco repeticiones. Se utilizaron jaulas (0,175 m^3 de capacidad) con 90 alevines de tilapia (0,34 ± 0,06 g) como unidades de cultivo e instaladas de forma individual en estanques de 8,4 m^3. No se observaron diferencias en el perfil hematológico entre los grupos después de 127 días de cultivo ($P > 0{,}05$), excepto para la hemoglobina, hematocrito, glucosa y niveles de neutrófilos. Las bacterias probióticas, suministradas individualmente o en combinación, colonizaron los intestinos de los peces, sin influir negativamente en la microflora intestinal bacteriana, tasa de crecimiento, tasa de composición corporal o los parámetros de calidad del agua ($P > 0{,}05$). Por lo tanto, la suplementación con probióticos en la dieta de juveniles de tilapia del Nilo altera el perfil hematológico, especialmente hemoglobina, hematocrito, glucosa y niveles de neutrófilos.

Palabras clave: perfil hematológico, tilapia, microflora intestinal, probióticos, crecimiento, acuicultura.

Corresponding editor: Jesús Ponce-Palafox

Aquaculture is of global economic importance. To improve productivity, performance, and fish health researchers have begun to investigate the use of alternatives to antibiotics, such as probiotics, prebiotics, symbiotic organisms, organic acids, and herbal remedies (Nayak, 2010; Cruz *et al.*, 2012; Mohapatra *et al*., 2013).

Probiotics are used worldwide in ecofriendly and sustainable aquaculture practices. Probiotics are living microorganisms that are used as dietary additives; they live in the gastrointestinal tract of the host, adhering to the epithelial wall and proliferating in the intestine. Probiotics may act in the reduction and prevention of infection by pathogens by improving the intestinal bacterial flora, reducing the load of harmful bacteria by producing inhibitory substances, and assisting in digestion by producing digestive enzymes and further stimulating the immune system. If they will be used as dietary supplements, they should be able to survive for long periods of storage (Cutting, 2011; Cruz *et al.*, 2012; Mohapatra *et al.*, 2013).

The use of microorganisms of the genus *Bacillus* in aquaculture is a nutritional management practice that is expanding rapidly in regions with intensive fish farming, mainly in Asia (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *B. subtilis* C-3102 are products approved by the European Food Safety Authority (EFSA). They are composed of lyophilized spores added to animal feed that contribute to the growth, feed efficiency, and modulation of the gastrointestinal flora. These strains are susceptible to antibiotics and have no toxigenic potential. These probiotics are commercially used for cattle, poultry, rabbits, and swine (Silley, 2006), and recently in fish (Albuquerque *et al.*, 2013; Mohapatra *et al*., 2013; Nakandakare *et al.*, 2013; Wild *et al.*, 2014).

Evaluation of hematological profiles has become a useful tool for revealing possible homeostatic changes in fish, allowing inferences about their health when exposed to adverse situations. Several authors have studied the influence of dietary supplements on hematological parameters in Nile tilapia (Ghiraldelli *et al.*, 2006; Nakandakare *et al.*, 2013), although further development of this technique is required.

This study aimed to evaluate gut colonization by probiotics, and their influence on the bacterial microflora, hematological profiles, growth rate and proximate composition, and water quality parameters during growth of juvenile Nile tilapia of the Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT) strain cultured in cages with commercial fish feed supplemented with *B. cereus* var. *toyoi* and *B. subtilis* C-3102.

The experiment was performed at the Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) in Toledo, Paraná, Brazil, from November 2009 to April 2010, over 127 days. 1800 Nile tilapia fry (*Oreochromis niloticus*) of the GIFT strain, sexually reverted, with an initial average weight of 0.34 ± 0.06 g, and an initial average size of 2.89 ± 0.26 cm, were purchased from a commercial fish farming operation.

The fingerlings were distributed in a completely randomized design comprising 20 cages of 0.175 m^3 capacity (0.5×0.5×0.7 m). The cages (4.0 mm mesh) were individually installed in 8.4 m^3 ponds. Each cage containing 90 fish was considered an experimental unit. The water temperature (ºC) and dissolved oxygen (mg L^{-1}) were monitored with a HI 9828 oxymeter. The hydrogen potential was measured with a HI 8424-pH meter, and conductivity (µS cm^{-1}) was recorded with a HI 9835 conductivity meter (Hanna® Instruments, São Paulo, Brazil). The water transparency (cm) was measured with a Secchi disk (Alfakit Ltda. Florianópolis, Santa Catarina, Brazil). The rainfall (mm) was monitored using a Vantage Pro2™ (Agrosystem, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) installed in the Meteorological Station of Catholic University of Parana, PUCPR/ Toledo, Paraná, Brazil. Data were collected weekly.

The experimental diet consisted of the commercial feed (Algomix® Agroindustria Ltda., Toledo, Paraná, Brasil) indicated for each phase of Nile tilapia culture supplemented with 0.5% lyophilized probiotics dissolved in 2% vegetable oil. Supplements of *B. subtilis* C-3102 (Comércio e Indústria Uniquimica Ltda.) and *B. cereus* var. *toyoi* (Sumitomo Chemical do Brazil Ltda.) were used, each containing 500 million spores per gram, proportionally; these were tested individually and combined. The control group that was not fed probiotics (T_1) was fed the basal diet supplemented with vegetable oil in the same proportion used in all experimental groups. The basal diet was supplemented with 0.5% *Bacillus cereus* var. *toyoi* (T_2), 0.5% *Bacillus subtilis* C-3102 (T_3), or 0.25% *B. cereus* var. *toyoi* + 0.25% *B. subtilis* C-3102 (T_4).

Biometry was performed monthly, and all individuals in each cage were collected to determine the total biomass, weight, and total amount of fish. The amount of feed to be provided was adjusted accordingly. For biometry, three fish from each cage were randomly collected for extraction of intestines and 10 mL of water, in order to quantify the total number of mesophilic bacteria, total coliforms, and colonization by probiotics per gram of intestine and per milliliter of water. Microbiological analyses were performed in the Laboratory of Microbiology at the Catholic University of Parana, PUCPR/Toledo, using the official analytical methods for microbiological analysis for control of animal

products and water, proposed by the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (Brasil, 2003).

The zootechnical performance was evaluated monthly using the biometry data. Thus, the growth performance was determined at the end of the experiment. Thirty-five fish per treatment were fasted, anesthetized, slaughtered, and dissected to determine the viscerosomatic and hepatosomatic body composition indices and visceral fat (Marengoni *et al.*, 2010; Albuquerque *et al.*, 2013). The chemical composition of the carcasses, including crude protein, dry matter, mineral matter, and ether extract was evaluated according to AOAC (2006).

After 127 days rearing, five fish were randomly collected, from each experimental unit; and anesthetized (75 mg eugenol L^{-1}) prior to blood sampling by caudal vein puncture with sterilized syringes (2 mL) and needles containing EDTA at 10%, as an anticoagulant agent. The blood was transferred to the Allabor laboratory (Allabor Laboratório de Alimentos Ltda., Toledo, PR) to determine the white blood cell (WBC) count and leukocyte differential count (neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils) using blood smears stained with May-Grunwald-Giemsa stain (Vallada, 1999). The erythrocyte series corresponding to red blood cells, hemoglobin and hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), variation in red cell volume (RDW), and platelet counts were assessed by an automatic counter according to the standard procedure (Campbell & Ellia, 2007).

Determination of glucose in fish blood was performed immediately after sampling, by applying a single drop of blood to an automatic glucose meter (model Advantage ACCU-CHEK® Softclix, with 200 Soft Clix lancets, F. Hoffmann-La Roche Ltd.).

The normality of experimental errors and homogeneity of variance for each trait were previously evaluated using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. The mean values were subjected to MANOVA or ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$) when significant differences were detected (StatSoft, 2005). Pearson correlation coefficient between results of counts on total mesophilic bacteria of samples from intestine and water were estimated.

Addition of probiotic *B. cereus* var. *toyoi* and *B. subtilis* C-3102 to the diet of Nile tilapia fingerlings resulted in colonization of the fishes' intestines and the aquatic culture environment without causing disease or mortality. The total number of mesophilic aerobic bacteria, as well as the number of coliforms, did not differ among the experimental groups, in either intestinal or water samples ($P > 0.05$). Mean CFU values for samples from tilapia intestines ranged from 2.08×10^5 to 3.85×10^5 for mesophilic and 2.61×10^3 to 3.85×10^3 for coliform bacteria, respectively. In the biometric analysis, no significant differences were observed among the groups for these parameters ($P > 0.05$). Values for total mesophilic bacteria were stable in all biometric analyses with no significant variation, regardless of the daily supply of probiotics or rainfall ($P > 0.05$) (Fig. 1). Throughout the experimental period, the counts for total mesophilic bacteria in samples from intestines and water showed no Pearson correlation ($r = 0.003$). No significant differences in the mean values for water quality parameters, assessed biweekly, were observed ($P > 0.05$).

After 127 days, the hemoglobin density was significantly higher in fish fed diets containing *B. cereus* than in those without probiotic addition ($P = 0.033$). The fish fed diets supplemented with *B. subtilis* alone and with *B. cereus* and *B. subtilis* combined differed significantly from those without probiotic supplementation in hematocrit concentration ($P = 0.027$). No significant difference was observed in values of RBC, WBC, MCH, MCHC, RDW, platelets, or MPV among the experimental groups ($P > 0.05$). The glucose concentration was higher in tilapia fed probiotic-free diets than in those receiving probiotics ($P = 0.002$) (Table 1).

Measurement of immune cells present in the blood showed a predominance of lymphocytes, followed by neutrophils, monocytes, and eosinophils. The neutrophil value was higher in the fish group fed a diet containing *B. subtilis* than in the group lacking probiotics ($P = 0.006$). The mean values for lymphocytes, eosinophils, and monocytes did not show significant differences among the experimental groups ($P > 0.05$) (Table 1).

The addition of probiotic *B. cereus* var. *toyoi* and/or *B. subtilis* C-3102 did not influence growth performance, body composition indices, or proximate composition of carcasses of juvenile Nile tilapia ($P > 0.05$). Similarly, Albuquerque *et al.* (2013) did not observe significant differences in hepatosomatic or viscerosomatic indices or visceral fat, but they reported lower values overall than those presented in this study, due to differences in the size of the fish. Visceral fat deposition was 2.1% to 1.7%, respectively, for fish fed diets containing *B. subtilis* C-3102 and those without probiotic supplementation, which is within expected levels for good performance of Nile tilapia, despite the addition of vegetable oil at 2% kg^{-1} for the addition of probiotics (Table 2).

B. cereus and/or *B. subtilis* colonized the intestines and the water in which the Nile tilapia were grown. Regardless of its source, the microorganism must be

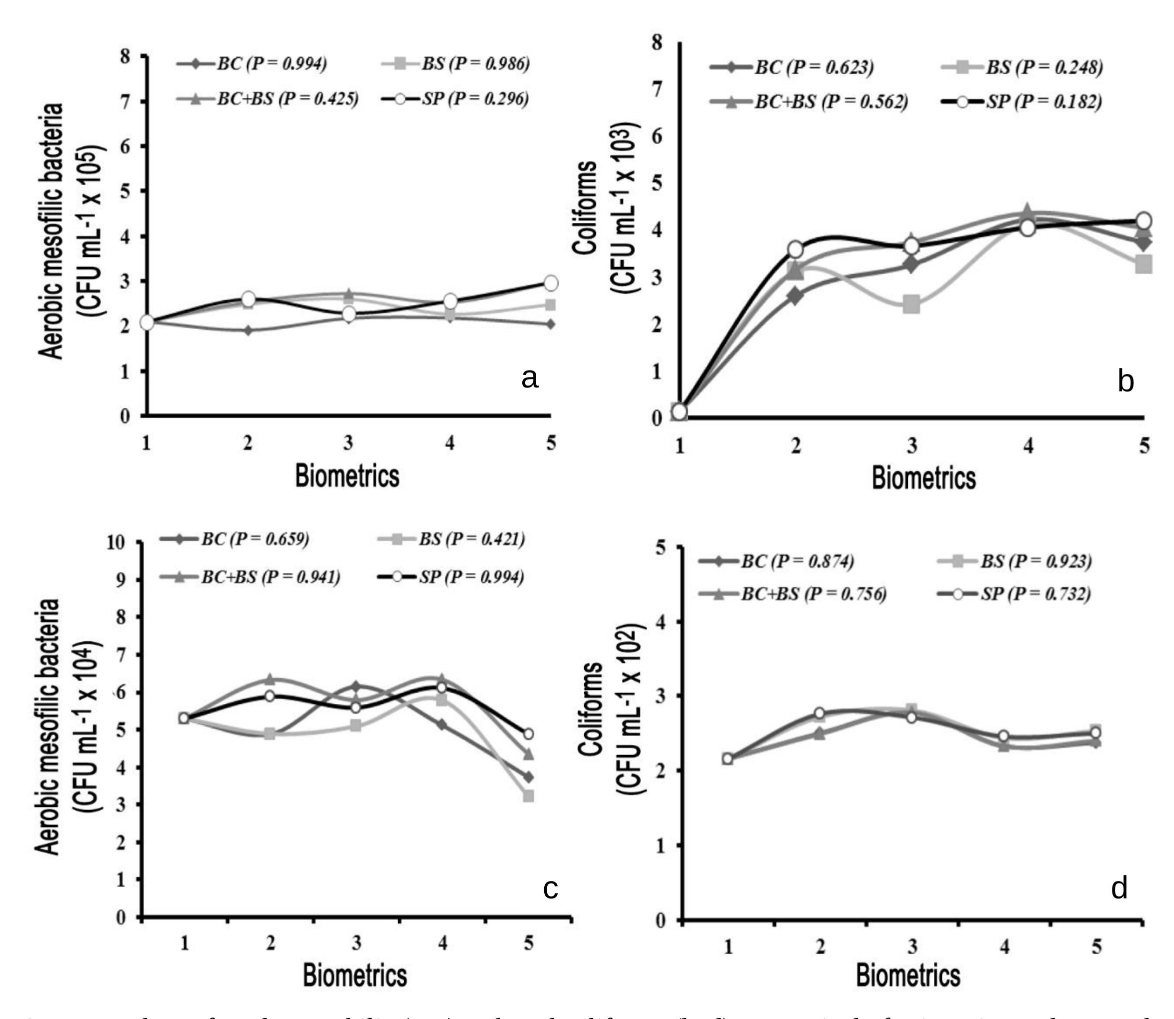


Figure 1. Mean values of total mesophilic (a, c) and total coliforms (b, d), respectively for intestine and water, during the cultivation of Nile tilapia fed on dietary probiotics into four experimental groups (0.5% *B. cereus* var. *toyoi* - BC, 0.5% *B. subtilis* C-3102 - BS, 0.25% *B. cereus* and 0.25 *B. subtilis* - BC + BS and without probiotic addition - SP).

able to establish, colonize, and multiply in the host gut without causing adverse effects, as observed in the present study (Nayak, 2010). Günther & Jimenez-Montealegre (2004), using *B. subtilis* as a probiotic for Nile tilapia, also found that the influence on the mesophilic bacterial community was relatively low; however, in the intestinal environment as well as in the water, this behavior could be offset by other positive effects such as production of bacteriocins to control pathogenic bacteria.

The environmental parameters used are considered suitable for cultivation of this species, and only the mean values for daily maximum temperature, which ranged from 23.4°C to 26.6°C, were somewhat below the ideal temperature indicated for growth of Nile tilapia (El-Sayed, 2006). Thus, the hematological profile values (Table 1) suggest that the addition of probiotics may have aided in tolerance of the stress caused by low temperatures during the rearing of tilapia juveniles in cages. Ghiraldelli *et al.* (2006) reported that the hematocrit could indicate the level of stress to which the fish are subjected. In this study, the values for hemoglobin and hematocrit concentration were significantly higher in fish fed diets containing *B. cereus* and/or *B. subtilis* compared to those without probiotics (Table 1). This suggests that juvenile tilapia fed dietary prebiotics were not stressed, as shown by the absence of mortality and the high levels of blood cell indices, indicating that fish were healthy, thus corroborating the studies by Nakandakare *et al.* (2013).

Concordant with the results reported here, Marengoni *et al.* (2010), Ridha & Azad (2012), and Albuquerque *et al.* (2013) found that addition of probiotics to the diet produced no differences in the performance of tilapia fingerlings. The authors reported the low temperature at which the fish were cultivated may have impaired nutritional efficiency, and suggested

Table 1. Hematological parameters (means ± SD) of juvenile Nile tilapia fed on dietary probiotics into four experimental groups T_1 = basal diet (BD) without probiotic, T_2 = BD + 0.5 % *B. cereus* (BC), T_3 = BD + 0.5% *B. subtilis* (BS); T_4 = BD + 0.25 % BC + 0.25 % BS. [1]RBC: red blood count, [2]MCV: mean corpuscular volume, [3]MCH: mean corpuscular hemoglobin, [4]MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, [5]RDW: red cell distribution width, [6]WBC: white blood count, [7]MPV: mean platelet volume. *P*-values for F test significance probability. CV: coefficient of variation. Different superscripts to values at the same line denote differences by Tukey test (α = 0.05).

Parameter	Probiotic diet group				*P* value	CV (%)
	T_1	T_2	T_3	T_4		
RBC (10^6 µL^{-1})[1]	1.60 ± 0.62	2.14 ± 0.42	2.24 ± 0.29	2.04 ± 0.13	0.055	17.18
Hemoglobina (g dL^{-1})	8.46 ± 0.90[b]	10.34 ± 1.14[a]	9.60 ± 0.98[ab]	9.14 ± 0.90[ab]	0.033	9.32
Hematocrit (%)	26.75 ± 10.19[b]	36.40 ± 8.29[ab]	38.10 ± 3.97[a]	37.84 ± 3.93[a]	0.026	16.48
MCV (fL)[2]	167.01 ± 10.60	171.46 ± 11.78	169.62 ± 6.97	185.82 ± 19.62	0.143	7.35
MCH (pg)[3]	66.28 ± 34.00	49.70 ± 10.60	42.96 ± 5.06	44.92 ± 4.91	0.154	32.13
MCHC (g dL^{-1})[4]	39.51 ± 19.82	29.40 ± 8.47	25.26 ± 2.22	24.60 ± 5.29	0.106	32.57
RDW (%)[5]	18.18 ± 4.64	16.68 ±1.91	12.98 ± 3.36	11.84 ± 5.17	0.110	28.50
Glucose (mg dL^{-1})	199.25 ± 28.92[a]	104.35 ± 72.24[b]	69.6 ± 21.87[b]	90.6 ± 30.90[b]	0.002	39.47
WBC (10^3 µL^{-1})[6]	13.31 ± 3.60	22.43 ± 1.71	16.60 ± 1.85	14.53 ± 3.02	0.226	51.08
Lymphocyte (10^3 µL^{-1})	11.5 ± 3.00	14.5 ± 6.70	13.2 ± 1.50	12.6 ± 3.10	0.245	17.76
Monocyte (10^3µL^{-1})	0.36 ± 0.23	0.58 ± 0.27	0.55 ± 0.68	0.34 ± 0.11	0.105	38.86
Neutrophil (µL^{-1})	1.28 ± 0.49[b]	1.55 ± 0.79[ab]	2.29 ± 0.52[a]	1.38 ± 0.18[b]	0.006	25.43
Eosinophil (µL^{-1})	0.22 ± 0.17	0.27 ± 0.16	0.30 ± 0.23	0.34 ± 0.49	0.553	46,53
Platelet (10^3 µL^{-1})	11.5 ± 3.60	13.6 ± 3.5	12.2 ± 4.2	12.2 ± 3.82	0.856	31.45
MPV (fL)[7]	11.56 ± 6.51	11.03 ± 6.05	10.86 ± 5.99	11.00 ± 6.15	0.952	18.43

Table 2. Growth rates and proximate composition (means ± standard deviation) of the Nile tilapia juveniles subject to fed on dietary probiotics into four experimental groups (T_1 = basal diet - BD without probiotic, T_2 = BD + 0.5 % *B. cereus* - BC, T_3 = BD + 0.5% *B. subtilis* - BS; T_4 = BD + 0.25 % BC + 0.25 % BS).

Parameter	Probiotic diet group				*P*
	T_1	T_2	T_3	T_4	
Final body weight (g fish^{-1})	89.52 ± 16.87	88.95 ± 16.59	100.52 ± 8.14	87.63 ± 11.39	0.44
Final biomass (kg)	6.5 ± 1.85	6.28 ± 1.03	7.69 ± 0.71	6.54 ± 1.17	0.19
Feed intake (kg)	10.43 ± 1.97	11.94 ± 0.92	12.83 ± 1.71	10.56 ± 0.00	0.23
Feed conversion ratio (kg kg^{-1})	1.96 ± 0.94	1.95 ± 0.31	1.69 ± 0.29	1.71 ± 0.71	0.84
Survival (%)	80 ± 18.00	85 ± 9.00	90 ± 2.00	88 ± 7.00	0.43
Daily weight gain (g fish^{-1})	0.70 ± 0.13	0.70 ± 0.13	0.79 ± 0.06	0.69 ± 0.09	0.44
Specific growth rate (% day^{-1})	4.15 ± 0.15	4.14 ± 0.15	4.24 ± 0.06	4.14 ± 0.10	0.47
Viscerosomatic index (%)	10.31 ± 1.00	10.4 ± 1.35	10.9 ± 3.03	9.71 ± 0.62	0.77
Hepatosomatic index (%)	2.24 ± 0.47	2.50 ± 0.39	3.00 ± 0.45	2.27 ± 0.33	0.26
Visceral fat (%)	1.67 ± 0.46	2.02 ± 0.29	2.10 ± 0.44	1.72 ± 0.39	0.56
Dry matter (%)	23.08 ± 1.42	23.80 ± 0.83	23.60 ± 1.14	23.6 ± 1.51	0.83
Crude protein (%)	13.48 ± 1.38	13.78 ± 0.90	13.65 ± 1.38	13.08 ± 0.58	0.78
Ether extract (%)	4.49 ± 0.67	4.78 ± 0.84	4.33 ± 1.00	4.13 ± 0.95	0.69
Mineral matter (%)	3.10 ± 1.11	3.08 ± 0.80	2.20 ± 0.64	2.96 ± 1.28	0.44

that food additives must be provided for a long period to produce beneficial effects. In contrast to our observations, Nakandakare *et al.* (2013) observed differences in the growth performance of Nile tilapia juveniles fed 4 g kg^{-1} of *B. subtilis* and *B. toyoi* over 63 days.

The addition of dietary *Bacillus* may have improved the nutrient absorption efficiency, which may have favored survival and nutrient retention efficiency in tilapia juveniles. According to Wild *et al.* (2014), the addition of probiotics, although it increases the cost of production, can contribute to the environmental sustai-

nability of systems for production of Nile tilapia, because it results in lower nutrient input into the ponds.

The probiotics *B. cereus* var. *toyoi* and *B. subtilis* C-3102 added individually or in combination at 0.5% in tilapia feed, colonized fish intestines without negatively affecting the intestinal bacterial microflora, or growth rates and proximate composition, or water quality parameters in the cultivation of Nile tilapia juveniles of the GIFT strain. Addition of dietary probiotics to juvenile tilapia influenced the hematological profile, especially the hemoglobin, hematocrit, glucose, and neutrophil levels, without strong variation, indicating that hematopoietic activity was not suppressed in either group.

REFERENCES

Albuquerque, D.M., N.G. Marengoni, W.R. Boscolo, R.P. Ribeiro, I. Mahl & M.C. Moura. 2013. Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. Cienc. Rural, 43(8): 1503-1508.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2006. Official methods of analysis. George Banta Co. Inc., Manasha, Winsconsin, 937 pp.

Brasil. 2003. Instrução Normativa N°62, de 26 de agosto de 2003, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária (Dispoa), Diário Oficial da União, Seção, 1: 14 pp.

Campbell, T.W. & C.K. Ellia. 2007. Avian and exotic animal hematology and cytology. Blackwell Publishing, Iowa, pp. 93-112.

Cruz, P.M., A.L. Ibáñez, O.A.M. Hermosillo & H.C.R. Saad. 2012. Use of probiotic in aquaculture. ISRN Microbiol., 13: 1-13.

Cutting, S.M. 2011. *Bacillus* probiotics. Food Microbiol., 28(2): 214-220.

El-Sayed, A.F.M. 2006. Tilapia culture. CABI Publishing, Cambridge, 277 pp.

Ghiraldelli, L., M.L. Martins, M.M. Yamashita & G.T. Jerônimo. 2006. Haematology of *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) and *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) maintai-ned in different conditions of handling and feeding from the State of Santa Catarina, Brazil. Acta Sci. Biol. Sci., 28(4): 319-325.

Received: 31 May 2014; Accepted: 3 March 2015

Günther, J. & R. Jimenez-Montealegre. 2004. Effect of the probiotic *Bacillus subtilis* on the growth and food utilization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under laboratory conditions. Rev. Biol. Trop., 52(4): 937-943.

Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan & L. Gibson. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274(1): 1-14.

Marengoni, N.G., D.M. Albuquerque, F.L.S. Mota, O.P. Passos-Neto, A.A. Silva-Neto, A.I.M. Silva & M. Ogawa. 2010. Desempenho e proporção sexual de tilápia vermelha sob à inclusão de probiótico em água mesohalina. Arch. Zootec., 59(227): 403-414.

Mohapatra, S., T. Chakraborty, V. Kumar, G. DeBoeck & K.N. Mohanta. 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 97(3): 405-430.

Nakandakare, I.B., M.K.P. Iwashita, D.C. Dias, L. Tachibana, M.J.T. Ranzani-Paiva & E. Romagosa. 2013. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilapias-do-Nilo: parâmetros hemato-lógicos, imunológicos e microbiológicos. Bol. Inst. Pesca, 39(2): 121-135.

Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish Shellfish Immunol., 29(1): 2-14.

Ridha, M.T. & I.S. Azad. 2012. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. Aquacult. Res., 43(6): 843-852.

Silley, P. 2006. Do bacteria need to be regulated? J. Appl. Microbiol., 101: 607-615.

StatSoft Inc. 2005. Statistica (data analysis software system), version 7.1. Disponível em: www.statsoft. com. Reviewed: 15 January 2015.

Vallada, E.P. 1999. Manual de técnicas hematológicas. Atheneu, São Paulo, 219 pp.

Wild, M.B., N.G. Marengoni, M.M.P.S. Vivian, C.Y. Tsutsumi & M.C. Moura. 2014. Probiótico dietético em sistemas de produção de tilápia do Nilo: efeitos sobre o crescimento, balanço de N e P, retenção de nutrientes e viabilidade econômica. Semina. Cienc. Agrar., 35(1): 477-490.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 607-615, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-24

Short communication

Morfología del aparato reproductor del picoroco *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) (Cirripedia, Balanidae)

Catalina Contreras[1], Nicolás Luna[1] & Enrique Dupré[1]
[1]Departamento de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar
Universidad Católica de Coquimbo, Calle Larrondo 1281, Coquimbo, Chile
Corresponding author: Enrique Dupré (edupre@ucn.cl)

RESUMEN. Descripción morfológica de las estructuras reproductivas de *Austromegabalanus psittacus* en dos periodos de maduración sexual. Se determinó que es un organismo hermafrodita que transfiere sus espermatozoides mediante un órgano intromitente o pene. El aparato reproductor masculino consta de testículos organizados en acinos que se distribuyen arboriformemente, dos conductos deferentes que se unen en la base del pene para formar el conducto eyaculador. El aparato reproductor femenino consiste principalmente en un ovario sacular que rodea al resto del cuerpo y se encuentra adherido a través de musculatura a la base de las placas operculares. Se organiza internamente en sacos acinares elongados que contienen ovogonias y ovocitos previtelogénicos adheridos a su pared y vitelogénicos y maduros libres dentro del lumen. Se observaron diferencias notorias en los ovarios entre los organismos recolectados en septiembre y octubre. En septiembre presentaron coloración amarillenta y en su interior se encontraron dos estructuras compactas denominadas lamelas ovígeras en cuyo interior se observaron ovocitos fecundados, embriones en diferentes estados de desarrollo y nauplius libres en la cavidad corporal; en octubre los ovarios son gruesos, blanquecinos y con gran cantidad de fluido lechoso en su interior.

Palabras clave: *Austromegabalanus psittacus*, cirripedios, aparato reproductor masculino, aparato reproductor femenino.

Reproductive system morphology of giant barnacle "picoroco" *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) (Cirripedia, Balanidae)

ABSTRACT. The reproductive structures of *Austromegabalanus psittacus* in two periods of sexual maturation were described. This organism is a simultaneous hermaphrodite, which transfers his sperm through an intromittent organ or penis. The male reproductive system consists of testes arranged in acini distributed in a tree-like structure, two vasa deferentia that come together to form the ejaculatory duct at the base of the penis. The female reproductive system consists mainly of a saccular ovary that surrounds the main body, which is internally organized into elongated acini bags containing oogonia and previtellogenic oocytes attached to the internal wall and free vitellogenic and mature oocyte within the lumen. Remarkable differences were observed in the ovaries between organisms collected in September and October. In September, they showed a yellowish ovary with two compact structures inside, called ovigerous lamellae with fertilized oocytes, embryos in different development stages and free nauplius in the body cavity, whereas in October the ovaries have a whitish in color and present a thick wall with a milky fluid inside.

Keywords: *Austromegabalanus psittacus*, cirripeds, male reproductive system, female reproductive system.

El cirripedio gigante cuyo nombre vernacular es picoroco se distribuye en la costa sur de Perú, costa de Chile y sur de Argentina (Young, 2000; López *et al.*, 2007, 2012). Este crustáceo cirripedio, además de ser un organismo de importancia ecológica, actúa como formador de hábitat al proporcionar sustrato para el desarrollo de otras especies, y sirve como alimento de algunos equinodermos y peces (Zagal & Hermosilla, 2007), y también constituye un recurso pesquero (Barker, 1976). Esta especie es extraída y comercializada extensamente por pescadores locales, debido a que no existe ninguna regulación específica para su extracción.

Corresponding editor: Sergio Palma

López *et al.* (2012) han señalado que esta especie muestra signos de sobre-explotación. Sus capturas anuales han disminuido considerablemente en los últimos años desde 620 ton en 1990 hasta 168 ton anuales en 2012 (SUBPESCA, 2003; SERNA-PESCA, 2012). Esta situación ha despertado el interés por cultivarlo comercialmente (López *et al.*, 2005, 2010, 2012), ya sea mejorando las técnicas de cultivo, para la comercialización y consumo, así como evaluando la factibilidad económica de su cultivo en el mar (Bedecarratz *et al*., 2011; López *et al*., 2012). Sin embargo, el conocimiento sobre su biología reproductiva aún está incompleto. Los estudios a este respecto se refieren a los primeros estados larvales, al proceso de fijación de la larva (López *et al.*, 2007) y a los procesos de muda y crecimiento (López *et al.*, 2003, 2008, 2010; López & López, 2005). Respecto a su biología reproductiva, Cancino *et al.* (1998) describieron estados de madurez sexual de las gónadas, gametos femeninos, índice gonadosomático (IGS), fecundidad y períodos de evacuación gamética. Sin embargo, no existen estudios exhaustivos sobre la morfología del aparato reproductor de ambos sexos, así como detalles del desarrollo embrionario y sobre la morfología de los gametos masculinos de esta especie. Estos antecedentes incentivaron el estudio de la morfología del aparato reproductor con énfasis en las estructuras de macho.

Ejemplares de picorocos, de longitud carino-rostral entre 1,16 y 3,30 cm fueron recolectados en Bahía La Herradura, Coquimbo, Chile (29º58'S, 71º22'W). Un grupo de 18 ejemplares se recolectó en septiembre de 2013 y otro de 15 ejemplares en octubre de 2013. Ambos grupos fueron mantenidos en estanques de 30 L con agua de mar microfiltrada a temperatura ambiente con aireación constante, fotoperiodo natural y recambio total del agua cada 7 días.

La morfología interna fue descrita, analizada y fotografiada bajo un microscopio con una cámara adosada (20-40x). Se midió (±0,1 mm) la longitud carino-rostral, largo del cuerpo, pene y conductos deferentes de cada individuo. La longitud del cuerpo blando, se midió desde la zona de adhesión a las placas calcáreas, en la región anterior, hasta la zona más distante correspondiente al testículo. Para la medición del pene se consideró la longitud máxima que alcanzaba al estirarlo manualmente, apoyándolo sobre una superficie plana.

Se extrajeron gametos de cada gónada (en fresco) y se analizaron bajo un microscopio con 100x. Trozos de testículos de tres individuos fueron fijados en Davidson (Carneiro & Junqueira, 2005), y procesados para histología. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina, analizados y medidos bajo un microscopio Olympus de 100x con reglilla graduada.

El aparato reproductor masculino está conformado por dos testículos, dos conductos deferentes y un pene (Fig. 1). Los testículos, de color blanquecino, están ubicados en la parte posterior o inferior del cuerpo blando del animal y son atravesados por el intestino de color oscuro (Fig. 1a). Los conductos deferentes se presentan como tubos delgados de color blanquecino plegados sobre sí mismos; miden en promedio 5,2 veces la longitud del cuerpo y se extienden desde la región superior de los testículos hasta la base del pene donde ambos conductos se unen para formar el conducto eyaculador (Fig. 1b). A partir de su mitad distal ambos conductos disminuyen gradualmente su grosor hasta unirse con el conducto eyaculador en la base del pene (Figs. 1b-1d).

Los testículos, presentan internamente una estructura arboriforme (Figs. 2b-2c) compuesta por acinos terminales que se abren en pequeños túbulos seminíferos (Figs. 2c-2e), que desembocan progresivamente en conductos de mayor diámetro hasta terminar en el conducto deferente. El proceso de espermatogénesis ocurre al interior de estos acinos, encontrándose las espermatogonias adosadas a las paredes acinares y de los túbulos seminíferos (Fig. 2e), mientras que los espermatocitos y espermatozoides pasan al lumen de éstos (Figs. 2d-2e). Los espermatozoides son móviles y de tipo primitivo con una cabeza ovalada o esférica y un flagelo (Fig. 2f) cuya longitud es de 12-15 veces la longitud de la cabeza.

El órgano intromitante (pene), cuando está contraído, se presenta tubular con un diámetro promedio de 1-1,5 mm (Fig. 3a) y una longitud promedio de 1,1 veces el cuerpo del organismo; desde su mitad distal se adelgaza hasta terminar en una punta aguda donde se insertan numerosas setas alrededor del orificio de salida de los espermatozoides (Figs. 3c-3d). Puede prolongarse entre 3-4 veces su tamaño inicial, al momento de transferir espermatozoides a la cavidad del manto de otro individuo vecino. En su interior, en la región central, se encuentra el conducto eyaculador que se extiende desde su base hasta el extremo distal agudo; es sinuoso cuando el pene se encuentra en reposo (Fig. 3b).

El aparato reproductor femenino consiste en dos ovarios saculares (Fig. 4a-4b), que envuelven al resto de los órganos presentando algunas zonas de coloración amarillenta a café claro de textura granulosa donde es posible encontrar ovocitos sin fecundar. La región inferior del ovario se encuentra adherida a la testa calcárea mediante un tejido muscular y translúcido de aspecto gelatinoso y su región superior está unida a la base de las placas del opérculo.

Al observar el interior de la estructura sacular de los ovarios de los individuos recolectados en septiembre,

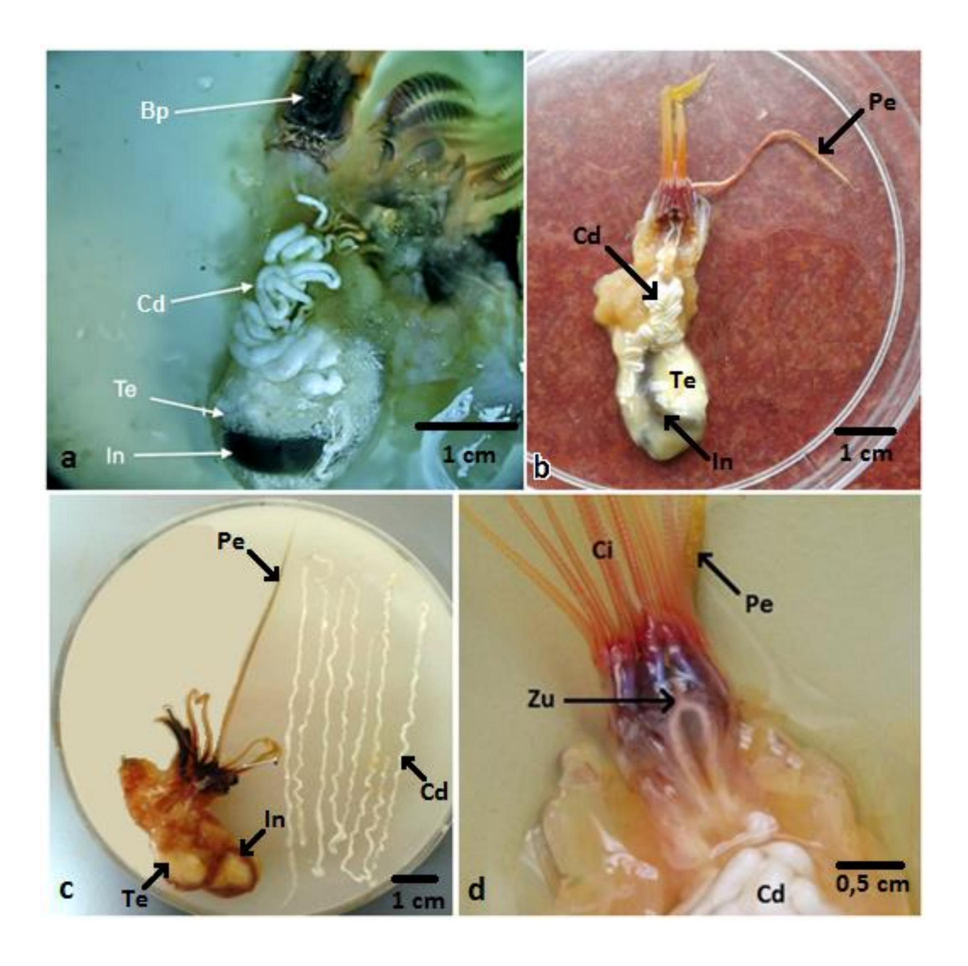


Figura 1. Aparato reproductor masculino de *Austromegabalanus psittacus.* a) Ejemplar obtenido en septiembre; testículos (Te), base del pene (Bp), conductos deferentes (Cd), b) ejemplar obtenido en octubre, c) longitud total de los conductos deferentes (Cd), pene elongado (Pe), testículo (te) e intestino (In), d) extremo apical de un individuo donde se observa la zona de unión (Zu) de los dos conductos deferentes (Cd) en la base del pene (Pe), intestino (In) y cirros (Ci).

se encontraron dos estructuras compactas en forma de riñón alargado, mencionadas por Cancino *et al.* (1998) y Pérez (2012) como "lamelas ovígeras", de color blanco amarillento y con textura granulosa (Fig. 4b). Estas estructuras están conformadas exclusivamente por huevos fecundados y embriones ovalados en diferentes estados de desarrollo, que están estrechamente unidos. El tejido ovárico que rodea estas "lamelas", en los individuos de septiembre, presentó una coloración amarillenta y no se observó la presencia de un fluido blanquecino y viscoso como ocurrió en los individuos extraídos en octubre.

Los picorocos obtenidos en octubre presentaron los ovarios de color blanco-amarillento, textura viscosa y consistencia flácida (Figs. 4c-4d). La pared ovárica presentó mayor grosor que la pared ovárica de aquellos obtenidos en septiembre. En su interior, no se encontraron embriones ni larvas en los organismos estudiados, sólo se observó la presencia de un líquido blanquecino de aspecto lechoso, que contenía gran cantidad de gránulos lipídicos (Fig. 4e).

El tejido ovárico de los individuos recolectados en septiembre, estuvo compuesto por folículos ováricos (Figs. 5a-5b) y conductos de evacuación. Los folículos se constituyen de un epitelio germinal con ovogonias y ovocitos previtelogénicos adheridos (Fig. 5b), además de ovocitos en diferentes estados de vitelogénesis y ovocitos maduros en el lumen del folículo. Los ovocitos previtelogénicos son transparentes (Figs. 5b), en cambio los vitelogénicos tempranos presentan diferente concentración de gránulos de vitelo y aun se puede observar la vesícula germinativa en medio de los gránulos (Fig. 5c). Los ovocitos maduros (Figs. 5d-5e) se encuentran libres en el lumen; la vesícula germinativa es enmascarada por la alta densidad de gránulos de vitelo de coloración rojiza y por la presencia de gotas lipídicas de diferentes diámetros (Fig. 5e).

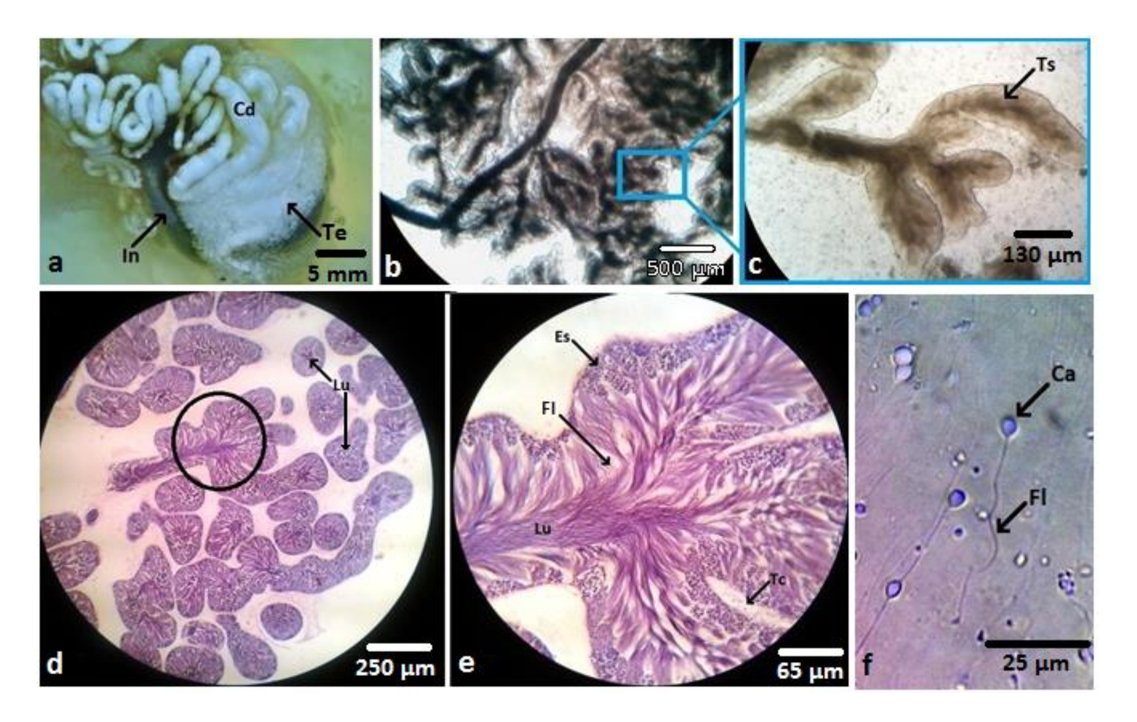


Figura 2. Testículo de *Austromegabalanus psittacus.* a) Estructura externa del aparato reproductor masculino en visión latero-posterior. Testículo (Te), conducto deferente (Cd), intestino (In) que rodea al testículo, b) organización interna arboriforme del testículo, c) organización lobular del testículo, con los túbulos seminíferos (Ts), d) cortes histológico transversales de los lóbulos testiculares, e) corte histológico longitudinal del testículo mostrando la organización de los lóbulos con espermatocitos (Es) con espermatozoides en la periferia y flagelos (Fl) en el lumen (Lu); entre los lóbulos se encuentra tejido conjuntivo (Tc), f) espermatozoides frescos: cabeza (Ca) y flagelo (Fl).

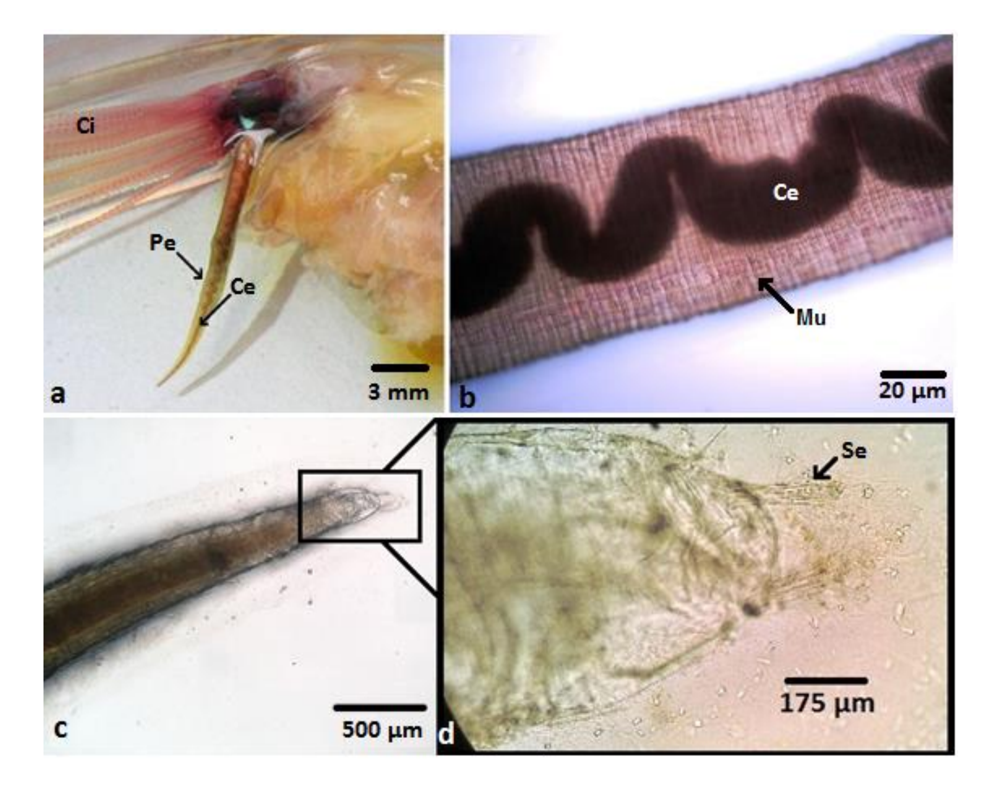


Figura 3. Pene de *Austromegabalanus psittacus*. a) Aspecto externo, b) conducto eyaculador sinuoso en el interior del pene (Ce); musculatura (Mu), c) extremo distal con setas, d) extremo distal con numerosas setas (Se) alrededor de la salida del conducto eyaculador (Ce).

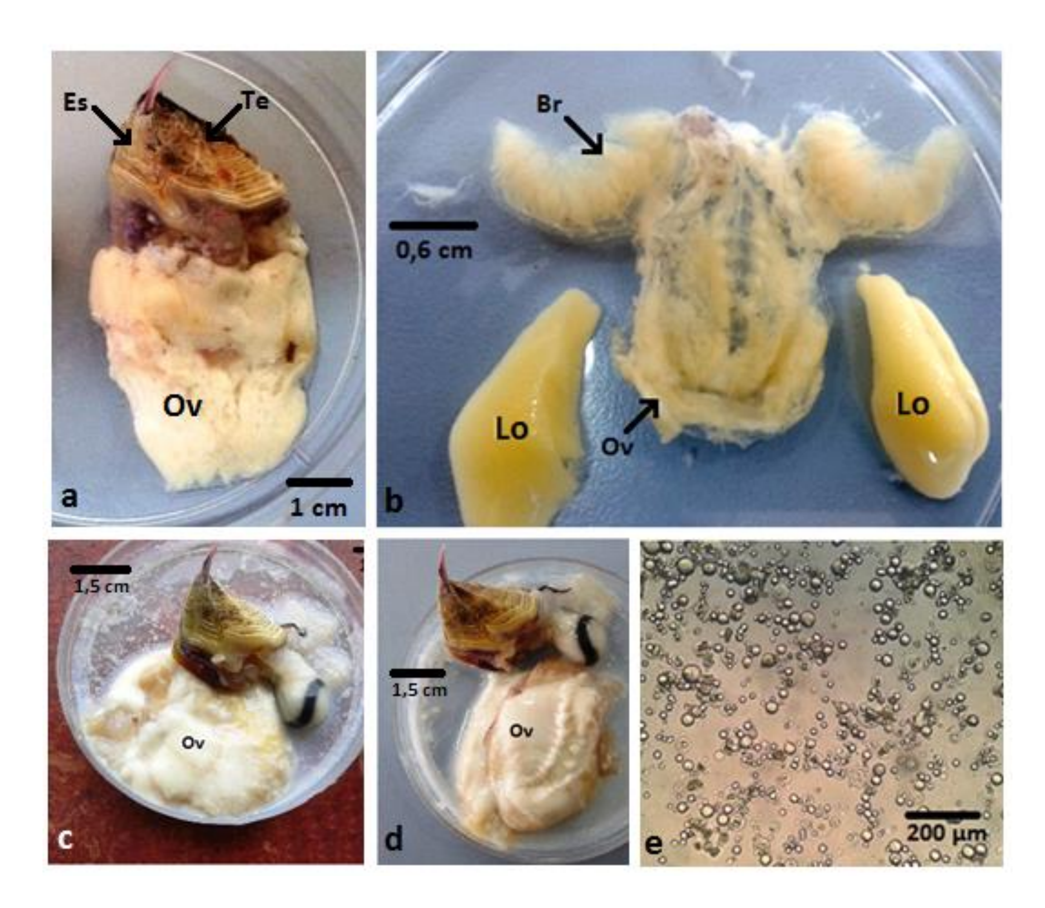


Figura 4. Aparato reproductor femenino de *Austromegabalanus psittacus*. a) Organismo completo mostrando ovarios (Ov), tergo (Te) y escudo (Es), b) lamelas ovígeras (Lo) extraídas desde los ovarios (Ov) de un individuo recolectado en septiembre, abierto lateralmente y con su pared interna expuesta; branquias (Br), c) parte externa de ovarios (Ov) de un individuo recolectado en octubre, d) parte interna de un individuo recolectado en octubre, e) gránulos lipídicos extraídos de los ovarios en octubre.

Dentro de las lamelas ovígeras se observaron embriones fuertemente unidos entre sí (Fig. 6a) y larvas nauplius en la periferia. Todos ellos presentan vitelo que contiene gránulos lipídicos claramente visibles (Figs. 6b-6c). Los embriones y larvas corresponden a diferentes estados de desarrollo, indicando que no hay sincronía en el desarrollo dentro de las lamelas (Figs. 6b-6d). También se observó la presencia de nauplius eclosionados (Figs. 6e-6f) con un par de anténulas unirramias y antenas birrámeas (Figs. 6f-6g).

En términos generales, las estructuras reproductivas de *A. psittacus* resultan morfológicamente similares a las de otras especies de cirripedios, particularmente de la familia Balanidae, tales como *Megabalanus azoricus*, *Chthamalus dalli* y *Chthamalus malanyensis* (Korn & Kolotukhina, 1984; Yan *et al.*, 2006; Dionisio *et al.*, 2007), presentando testículos con organización acinar con numerosos túbulos seminíferos dispuestos alrededor del intestino, así como ovarios con células germinales en distintos estados de maduración. Esto último también coincide con lo reportado por Fyhn & Costlow (1977) para *Balanus amphitrite* y *B. eburneus*.

La gran longitud del órgano intromitente, constituido por musculatura longitudinal y transversal (Darwin, 1854), en relación con el cuerpo del animal se explica por la necesidad de llegar a conespecíficos vecinos para realizar la fecundación cruzada, lo cual podría descartar la autofecundación para esta especie, como ocurre en otros cirripedios (Bertness *et al.*, 1991; Southward, 1998; Barnes & Crisp, 2009). Sin embargo, es necesario realizar estudios tendientes a determinar el modo de fecundación que ocurre en *A. psittacus* ya que recientemente Barazandeh *et al.* (2013) han reportado que en el cirripedio *Pollicipes polymerus* ocurre la liberación y captura de gametos masculinos desde la columna de agua.

Respecto a las setas encontradas en el extremo distal del pene, podría tratarse de órganos sensoriales, ya que Walley *et al.* (1971) señalaron que en *B. balanoides* el individuo que extiende su pene hacia un cirripedio ve-

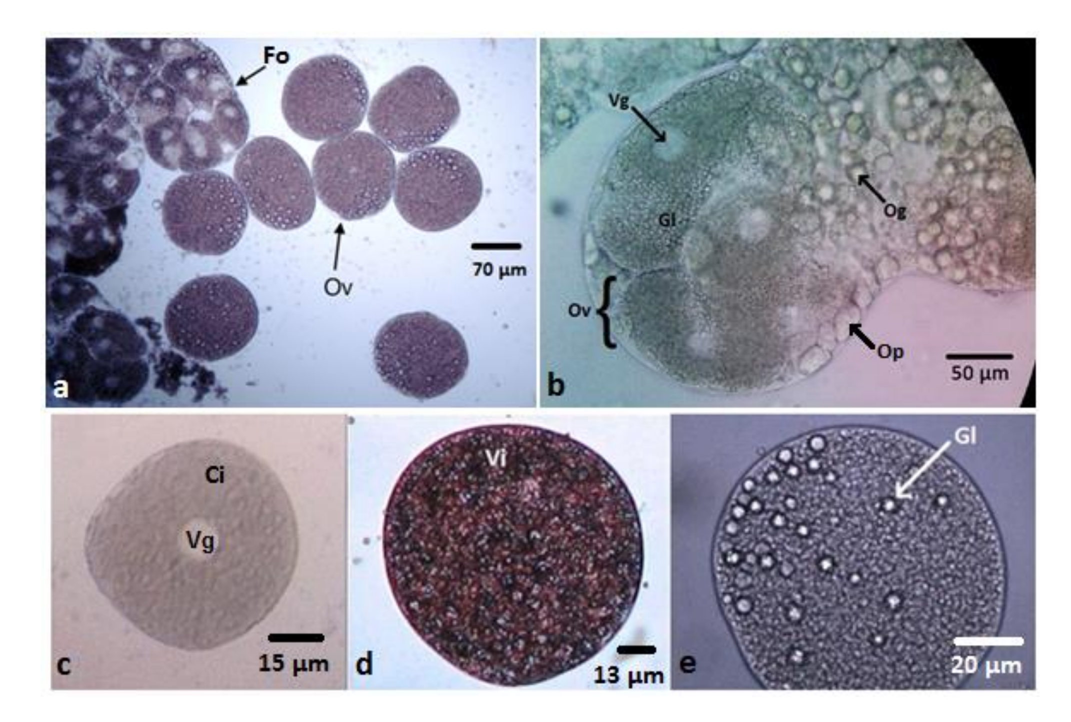


Figura 5. Ovocitos de *Austromegabalanus psittacus* en diferentes estados de maduración. a) Folículos ováricos (Fo) y ovocitos libres (Ov), b) folículo ovárico; ovogonias (Og), ovocitos previtelogénicos (Op) y vitelogénicos (Ov) con sus vesículas germinativas (Vg), y gránulos lipídicos (Gl) en su interior, c) ovocito previtelogénico; citoplasma (Ci) y vesícula germinativa (Vg), d) Ovocito maduro con vitelo (Vi) en su interior, e) ovocito maduro con gránulos lipídicos (Gl) en su interior.

cino, debe comprobar si este acepta la inseminación y luego inducirlo al desove.

Los folículos ováricos encontrados en el tejido ovárico de *A. psittacus* (presente estudio) corresponden con lo señalado por Cancino *et al.* (1998) como "paquetes" de ovocitos. Al igual que para *M. azoricus* (Dionisio *et al.*, 2007), el presente estudio estableció que *A. psittacus* presenta testículos y ovarios maduros simultáneamente, lo cual corrobora la ocurrencia de hermafroditismo simultáneo en esta especie, señalado por Cancino *et al*. (1998).

La gran cantidad de ovocitos maduros encontrados en el ovario y las lamelas repletas de embriones, de los individuos de septiembre, sugiere que durante este mes ocurre la fecundación y eclosión de las larvas conservadas dentro de las lamelas. Este estado de madurez plena coincide con lo registrado por Cancino *et al.* (1998), que señalan que el periodo de mayor porcentaje (>90%) de individuos maduros ocurre entre junio y octubre, y en los siguientes meses disminuye considerablemente.

Otro aspecto que resalta en el aparato reproductor femenino, es la consistencia compacta de las lamelas ováricas que les confiere forma de riñón bien definida (Fig. 4b). Esta forma compacta podría ser determinada por la cohesión de la masa de huevos originada por la fuerte unión de las cubiertas de fecundación de cada uno de los ovocitos adyacentes (Fig. 6d), como ocurre en *B. balanoides* (Walley *et al*., 1971). En esta última especie, los ovocitos fecundados forman una delgada cubierta de fecundación, la cual se engruesa y se vuelve muy adhesiva por la aparición en el interior de una segunda cubierta que se une a la primera (Walley *et al*., 1971).

Las diferencias en la morfología de las gónadas observadas entre los individuos recolectados en septiembre y octubre se pueden explicar por el proceso de evacuación de las larvas nauplius, lo cual ocurre justamente en esta época del año. Los individuos estudiados en octubre (post-evacuación de larvas) tenían un tejido de aspecto lechoso con gran cantidad de líquido con gránulos lipídicos en el interior de la testa. Esto último se debe a la formación del vitelo en nuevos ovocitos, el cual podría ingresar a los ovocitos primarios por pinocitosis, como ocurre en moluscos y artrópodos. Para clarificar más esta situación se sugiere el estudio sostenido de un mayor número de individuos para observar las variaciones morfológicas de las gónadas a lo largo del año.

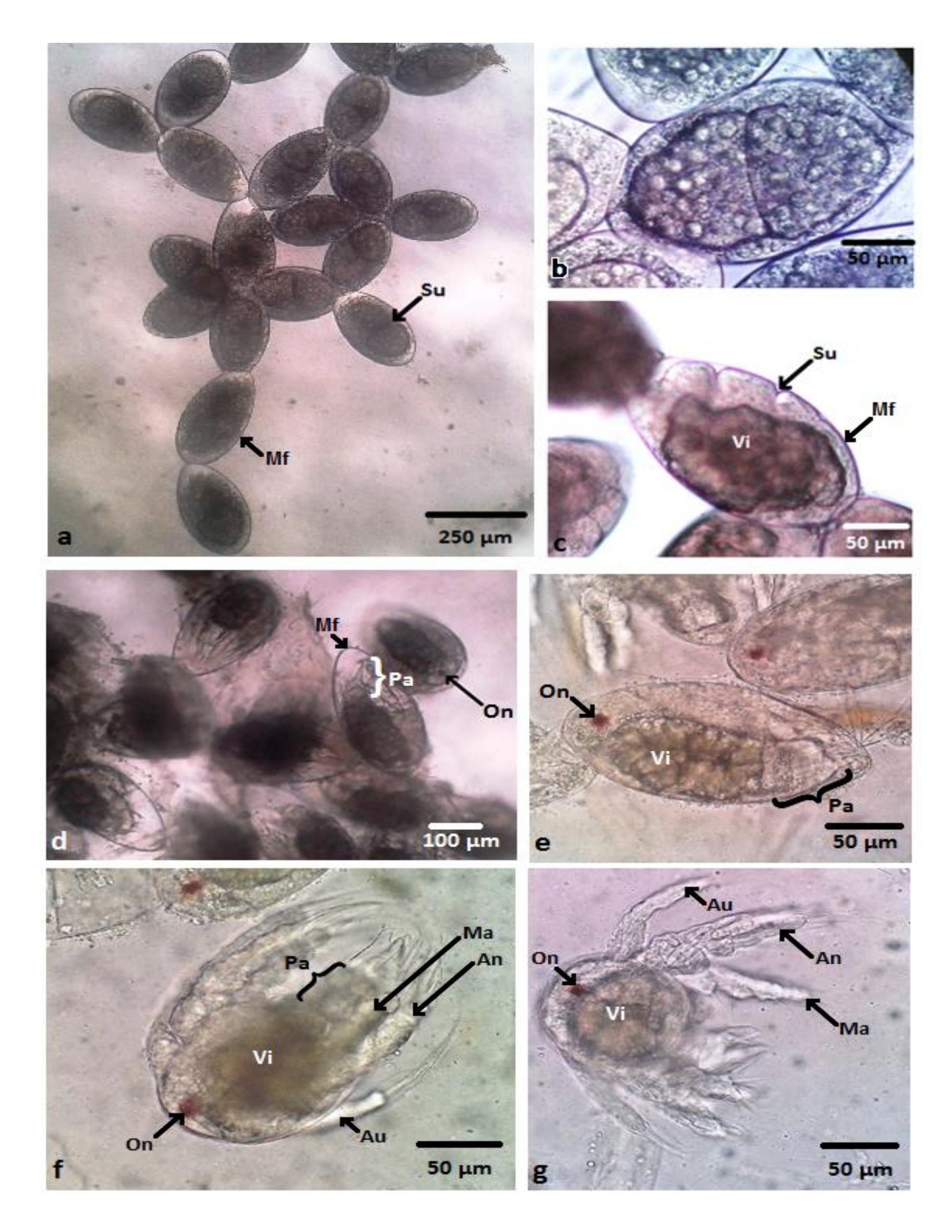


Figura 6. Embriones y larvas nauplius de *Austromegabalanus psittacus* extraídas de las lamelas ovígeras y disgregadas. a) Embriones en estados tempranos del desarrollo; cubierta de fecundación (Mf), b) embrión en estado inicial. c) embrión en estado temprano mostrando los primordios embrionarios (Su) y el vitelo (Vi), d) nauplius en estado temprano de desarrollo; proceso abdominal (Pa); ojo naupliar (On), e), f) y g) nauplius en diferentes estados de desarrollo; anténula (Au), antena (An) y maxila (Ma).

Dionisio *et al.* (2007) y Bettini (2009), señalan que las larvas se mantienen dentro del individuo hasta el estado de nauplius I antes de ser expulsadas al medio. Este antecedente, junto con la presencia de larvas nauplius en el interior de los individuos de *A. psittacus*, permite sugerir que la liberación de larvas en esta especie ocurriría alrededor de septiembre en la zona de Coquimbo. Esta suposición es reforzada por la presencia de ovarios flácidos y sin embriones en octubre. Este evento podría también coincidir con la época de muda de esta especie, ya que Pérez (2012) observó la evacuación de larvas junto con la detección de restos de muda.

REFERENCIAS

Barazandeh, M., C. Davis, C. Neufelt, D. Coltman & R. Palmer. 2013. Something Darwin didn't know about

barnacles: spermcast mating in a common stalked species. Proc. R. Soc. Bid. Sci., 2012.2919. doi.org/ 10.1098/rspb.

Barker, M. 1976. Culture and morphology of some New Zealand barnacles (Crustacea: Cirripedia). N. Z. J. Mar. Fresh. Res., 10(1): 139-158.

Barnes, H. & D. Crisp. 2009. Evidence of self-fertilization in certain species of barnacles. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 35: 631-639.

Bedecarratz, P., D. López, B. López & O. Mora. 2011. Economic feasibility of aquaculture of the giant barnacle *Austromegabalanus psittacus* in southern Chile. J. Shellfish Res., 30(1): 147-157.

Bertness, M., S. Gaines, D. Bermudez & E. Sandford. 1991. Extreme spatial variation in the growth and reproductive output of the acorn barnacle *Semibalanus balanoides*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 75: 91-100.

Bettini, F. 2009. Cirripedia-Cirripedios. In: V. Häussermann & G. Försterra (eds.). Fauna marina bentónica de la Patagonia Chilena. Nature in Focus, Santiago, pp. 599-622.

Cancino, M., C. Hernández, O. Chong, R. Iriarte & F. Avilés. 1998. Estudio del ciclo vital del piure y picoroco en la VIII Región. Informe Final, Proyecto FIP Nº96-49: 165 pp.

Carneiro, J. & L. Junqueira. 2005. Histología básica. Masson S.A., Barcelona, 640 pp.

Dionisio, M., A. Rodríguez & A. Costa. 2007. Reproductive biology of *Megabalanus azoricus* (Pilsbry), the azorean barnacle. Invertebr. Reprod. Dev., 50(3): 155-162.

Darwin, C.R. 1854. A monograph on the sub-class Cirripedia, with figures of all the species. The Balanidae (or sessile cirripedes; the Verucidae, etc.). C. & J. Adlard Printers, London, Ray Soc., 2: 684 pp.

Fynh, U. & J. Costlow. 1977. Histology and histochemistry of the ovary and oogenesis in *Balanus amphitrite* L. and *B. eburneus* Gould (Cirripedia, Crustacea). Biol. Bull., 152: 351-359.

Korn, O. & N. Kolotukhina. 1984. Reproduction of the barnacle *Chthamalus dalli* in the Sea of Japan. Sov. J. Mar. Biol., 9: 84-91.

López, B.A. & D.A. López. 2005. Moulting frecuency and behavioural responses to salinity and diesel oil in *Austromegabalanus psittacus* (Molina) (Cirripedia: Balanidae). Mar. Freshw. Behav. Physiol., 38(4): 249-258.

López, D.A., J.M. Castro, M.L. González & R.W. Simpfendörfer. 2003. Physiological responses to hipoxia and anoxia in the giant barnacle *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782). Crustaceana, 76(5): 533-545.

López, D.A., B.A. López-Burgos, S.E. Arriagada & M.L. González. 2007. Consequences of base modification in hummocks of the barnacle *Austromegabalanus psittacus*. N. Z. J. Mar. Freshwater. Res., 41(3): 291-298.

López, D.A., E.A. Espinoza, B.A. López & A.F. Santibañez. 2008. Molting behavior and growth in the giant barnacle *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782). Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 43(3): 607-613.

López, D.A., B.A. López, M.L. González & S.E. Arriagada. 2005. Aquaculture diversification in Chile: potential culture of giant barnacles. Glob. Aquacult. Advocate, 8(2): 73-74.

López, D.A., B.A. López, C.K. Pham, E.J. Isidro & M. De Girolamo. 2010. Barnacle culture: background, potential, and challenges. Aquacult. Res., 41: 367-375.

López, D.A., B.A. López, S.E. Arriagada, O.A. Mora, P.C. Bedecarratz, M.D. Pineda, M.L. González, L.J. Andrade, J.M. Uribe & V.A. Riquelme. 2012. Diversification of Chilean aquaculture: the case of the giant barnacle *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782). Lat. Am. J. Aquat. Res., 40(3): 596-607.

Pérez, M. 2012. Las incrustaciones biológicas (biofouling) y metodologías para su control. Tesis Doctorado en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 207 pp.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA). 2012. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Anuario Estadístico de Pesca. [http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_-content&task-=view&id=1692&Itemid=889]. Revisado: 12 junio 2014.

Southward, A. 1998. Novas observações sobre as cracas (Crustacea: Cirripedia) na região dos Açores. Arquipélago. Ciénc. Biol. Mar., 16A: 11-27.

Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SUBPESCA). 2003. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Informe técnico (R. Pesq.) Nº10. Cierre de registro pesquero artesanal de recursos bentónicos en la II Región. [http://www.subpesca.cl/publicaciones/606/articles-73738_documento.pdf]. Revisado: 20 enero 2015.

Walley, L., F. White & M. Brander. 1971. Sperm activation and fertilization in *Balanus balanoides*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 51: 489-494.

Yan, Y., K. Benny & A. Williams. 2006. Reproductive development of the barnacle *Chthamalus malayensis* in Hong Kong: implications for the life-history patterns of barnacles on seasonal, tropical shores. Mar. Biol., 148: 875-887.

Young, P. 2000. Cirripedia Thoracica (Crustacea) collected during the Campagne de La Calypso (1961-1962) from the Atlantic Shelf of South America. Zoosystema., 22(1): 58-100.

Zagal, C. & C. Hermosilla. 2007. Guía de invertebrados marinos del sur de Chile. Editorial Fantástico Sur, Punta Arenas, 165 pp.

Received: 10 April 2014; Accepted: 20 March 2015

Lat. Am. J. Aquat. Res., 43(3): 616-620, 2015
DOI: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-25

Short Communication

Comparative analysis of the reproductive strategy of lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in Baja California Sur, Mexico

Marco A. Angel-Dapa[1], Marcial Arellano-Martínez[1], Bertha P. Ceballos-Vázquez[1] Hector Acosta-Salmón[2] & Pedro E. Saucedo[2]
[1]Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas
Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo. Postal 592
La Paz, B.C.S. 23096, México
[2]Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo 195
Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S. 23000, México
Corresponding author: Pedro E. Saucedo (psaucedo04@cibnor.mx)

ABSTRACT. The reproductive strategy of lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* was evaluated in a culturing system in Bahía Tortugas, Baja California Sur, Mexico during an annual cycle, comparing its response with data previously reported at other localities. High frequencies of ripe gonads throughout the year indicate that reproduction was continuous, with two main ripening/spawning events: July-September and December-March. A continuous breeding is also reported for the species in Bahía Magdalena, Bahía Juncalito, and Bahía de Los Angeles. These eutrophic areas are Biological Active Centers where gametogenesis appears to be regulated by the energy taken from recently ingested food following an opportunistic strategy. However, the digestive gland index decreased and the muscle indices increased during one of the breeding peaks, suggesting that some stored reserves are also used to sustain gametogenesis (conservative strategy) partially. High incidences of atretic oocytes are likely associated with atypical daily variations in water temperature from May through September (12 to 33°C), or with stressful conditions in the culturing system in summer. Despite this, the culturing system set in Bahía Tortugas appears beneficial for a continuous reproduction of *N. subnodosus*.

Keywords: culturing system, gametogenesis, lion's paw scallop, lipid index, morpho-physiological indices, reproductive strategy.

Análisis comparativo de la estrategia reproductiva de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* en Baja California Sur, México

RESUMEN. La estrategia reproductiva de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* se estudió en un sistema de cultivo en Bahía Tortugas, Baja California Sur, México durante un ciclo anual, comparando su respuesta con datos previamente reportados para otras localidades. La alta frecuencia de gónadas maduras durante todo el año indica que la reproducción es continua, con dos eventos principales de madurez/desove: julio-septiembre y diciembre-marzo. Una gametogénesis continua también se reporta para esta especie en Bahía Magdalena, Bahía Juncalito y Bahía de Los Ángeles. Estas áreas eutróficas son Centros de Actividad Biológica, donde la gametogénesis estaría regulada por la energía del alimento recientemente ingerido siguiendo una estrategia oportunista. Sin embargo, el índice de la glándula digestiva disminuyó y el índice del músculo aumentó durante uno de los máximos de madurez, indicando un uso parcial de reservas energéticas para sustentar la gametogénesis (estrategia conservadora). La alta incidencia de ovocitos atrésicos se atribuye a variaciones diarias atípicas en la temperatura de mayo a septiembre (12 a 38°C) o a condiciones estresantes en el sistema de cultivo en verano. Sin embargo, Bahía Tortugas parece beneficiar una reproducción continua de *N. subnodosus*.

Palabras clave: sistema de cultivo, gametogénesis, almeja mano de león, índice lipídico, índices morfo-fisiológicos, estrategia reproductiva.

In temperate bivalves, seasonal changes in environmental factors regulate overall patterns of energy acquisition and allocation, and with this, important aspects of gametogenesis, such as gamete maturation, growth, release, and reabsorption (Barber & Blake, 2006; Benninger & Le Pennec, 2006). In hermaphrodite

Corresponding editor: Enrique Dupré

scallops, reproductive events may operate differently than in protandric bivalves, and differences may occur between species or populations of the same species separated along wide or narrow latitude ranges (Arellano-Martínez *et al.*, 2004, 2011). Thus, the expression of reproductive events in a particular geographic area may be analyzed in relation to the type of strategy (opportunistic or conservative) that a species uses to initiate and sustain gametogenesis from exogenous or endogenous energy reserves.

The lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby I, 1835) is an hermaphrodite bivalve with high potential for commercial cultivation in north-western Mexico, but natural populations are overexploited and exposed to wide variations in temperature and availability of food (Morales-Zárate *et al.*, 2011; Ponce-Díaz *et al.*, 2011). Thus, different reproductive patterns (seasonal or continuous) have been reported for wild (Arellano-Martínez *et al.*, 2004; Yee-Duarte, 2009) and cultivated stocks (Racotta *et al.*, 2003; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004; Arellano-Martínez *et al.*, 2011). This study analyzed the reproductive strategy of *N. subnodosus* in a commercial farm located in a place where reproduction of the species has yet not been studied: Bahía Tortugas, Baja California Sur, Mexico. The results were compared with previously reported data for wild and cultured scallops at other temperate and subtropical localities.

Hatchery-reared *N. subnodosus* juveniles were transferred to the field and seeded in a culturing system in Bahía Tortugas, in the western Pacific coast of the Baja California Peninsula (27º41'30"N, 114º53'45"W) (Fig. 1). Juvenile scallops were grown under suspension conditions at 5 m depth in Japanese lanterns held from 60 m long lines. Overall maintenance to remove fouling and to adjust stocking density to ~50% occupation area of the lantern was conducted every two months, as recommended by Velasco *et al.* (2009).

Thirty scallops (7-8 months old; 74 ± 0.69 mm SD shell height) were collected monthly during the annual cycle April 2009-March 2010. Parallel to samplings, water temperature was registered daily with a digital HOBO thermograph placed at 5 m depth, and concentration of chlorophyll-*a* (µg L^{-1}) was obtained for each sampling day using Modis AQUA satellite imagery from the NOAA database (http://coastwatch.pfeg.noaa.gov). Collected scallops were taken to the laboratory and dissected to excise male and female gonads, which were fixed in Davidson's solution for 48 h for histological and histochemical analyses using 5-µm slides. Gonads were classified as undifferentiated, early developed, late developed, ripe, partially spawned, spent, and reabsorbed (atretic), as proposed by Arellano-Martínez *et al.* (2004, 2011). A detailed

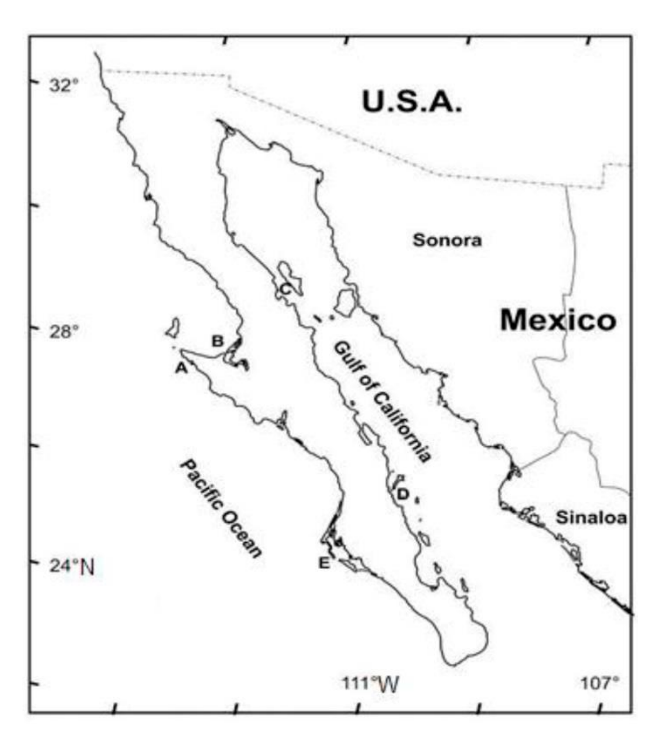


Figure 1. Geographic location of the study area (A: Bahía Tortugas) and other sites of the Baja California Peninsula where reproduction of wild and cultivated lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* has been studied (B: Laguna Ojo de Liebre, C: Bahía de Los Angeles, D: Bahía Juncalito, and E: Bahía Magdalena).

description of each developmental stage can be consulted in Arellano-Martínez *et al.* (2004). Due to stormy weather conditions in August, the collection of scallops for histological analysis was impossible. Additionally, five areas of each ovary were selected and images of 30 oocytes per area were measured to determine oocyte diameter (µm). To measure the lipid (triglyceride) content of oocytes, replicated gonad slides were stained with Black Sudan B and processed with Image Pro Plus software to determine a lipid index (LI) (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008):

$$I = \left(\frac{AL}{OA}\right) \times 100$$

where AL = area covered by lipid droplets in the oocyte (in pixels) and OA = oocyte area (µm^2).

Collected scallops were measured for shell height (±0.1 mm) and weighed for fresh live biomass (±0.1 g). The weights of the gonad, digestive gland, adductor muscle, and mantle were also registered (±0.1 g) to determine a gonadosomatic index (GSI), digestive gland index (DGI), adductor muscle index (AMI), and mantle tissue index (MI) (Arellano-Martínez *et al.* 2004):

$$DGI, AMI, MI = \left(\frac{TW}{SW}\right) \times 100$$

where *TW* = weight of each somatic tissue (g) and *SW* = live weight of scallops without shell (g).

One-way ANOVA were used to determine significant differences in oocyte diameter and tissue indices as a function of time, followed by multiple range analysis of media with the Tukey test when needed. The relationship between tissues indices (DGI, AMI, MI), environmental factors, and GSI was analyzed with correlation analyses (Sokal & Rohlf, 1995). Previously, data (%) were *arcsin* transformed. For all analyses, the significance level was preset at $P < 0.05$.

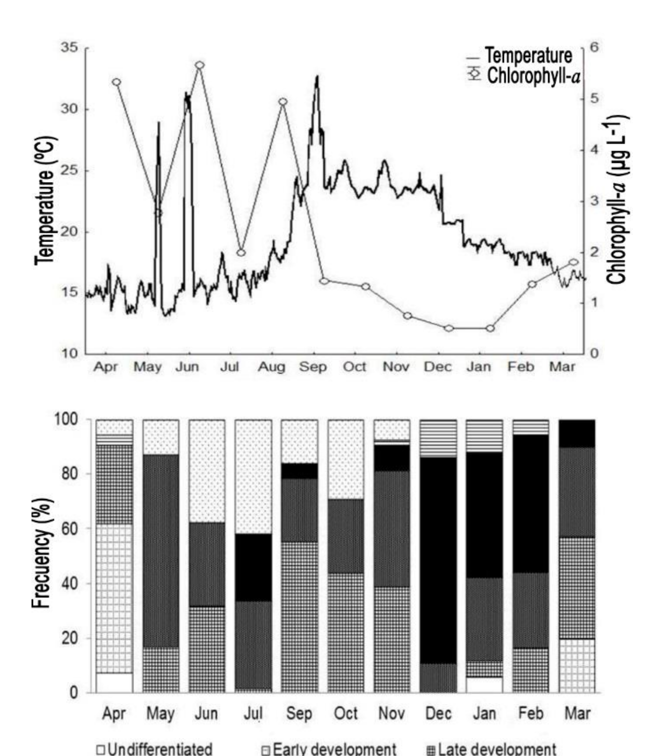
Variations in water temperature and chlorophyll-*a* in Bahía Tortugas followed a typical seasonal pattern (Fig. 2) and maintained an inverse relationship with each other ($r = 0.87$). Lower values occurred in spring (temperature) and summer (chlorophyll-*a*) and higher values in summer-autumn (temperature) and spring-summer (chlorophyll-*a*). There were, however, large temperature oscillations in May-June (13 to 32°C) and September (22.5 to 33°C).

The histological analysis showed that late developed and ripe gonads occurred all year round (Fig. 2), with two spawning events in July through September and December through March. Regressing gonads occurred from April through November, with a peak in July (41.5%) that coincided with atypical increases in water temperature.

Significant changes in the oocyte diameter ($P < 0.05$) occurred over time, with two periods of size increase in July (54.5 ± 3.08 µm SE) and January (50.4 ± 2.64 µm). These changes were significantly correlated with changes in the LI ($r = 0.82$), which peaked again in July (63.3 ± 3.41) and January (56.1 ± 4.6 µm) (Fig. 2).

All condition indices varied significantly over time ($P < 0.05$), with peak values occurring in July (GSI), September–November (DGI), March (AMI), and July (MI). Changes in the GSI (4.4% to 20%) were not significantly correlated with changes in temperature ($P > 0.05$). Mean DGI (9.6% to 10.7%) and MI (49.9 to 28.7%) values were not significantly correlated with the GSI ($P > 0.05$), but it was significant ($P < 0.05$) between the AMI (17.3 to 21.8%) and the GSI.

The high proportion of ripe gonads (with large oocytes) in most sampled months indicate that gametogenesis of *N. subnodosus* in Bahia Tortugas was continuous under the conditions prevailing in the culturing system. A continuous reproduction is also reported for the species at other subtropical and temperate localities of the Baja California Peninsula (Fig. 1), including scallops cultivated in Bahía Magdalena (Racotta *et al.*, 2003) and Bahía Juncalito



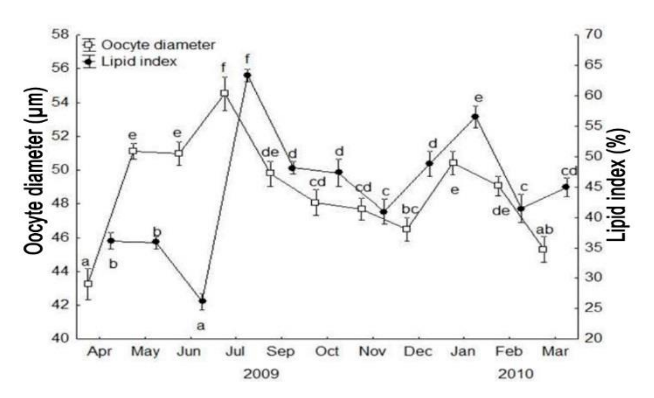


Figure 2. Mean variations in water temperature at 5 m depth (daily) and concentration of chlorophyll-*a* (monthly); frequencies of gonad developmental stages, and diameter and lipid index of oocytes of lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culturing system in Bahía Tortugas, Mexico during the annual cycle April 2009-March 2010. Means sharing the same superscript denote lack of significantly differences ($P < 0.05$). Bars show the mean ± standard errors.

(Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004), as well as wild scallops from Bahía de Los Angeles (Yee-Duarte, 2009). The three sites, together with Bahía Tortugas, are eutrophic areas reported as Biologically Active Centers or BAC, which offer high primary productivity all year round and optimum conditions for filter feeders to maintain a prolonged breeding (Lluch-Belda *et al.*, 2000; Morales-Zárate *et al.*, 2011). Under these conditions, gameto-

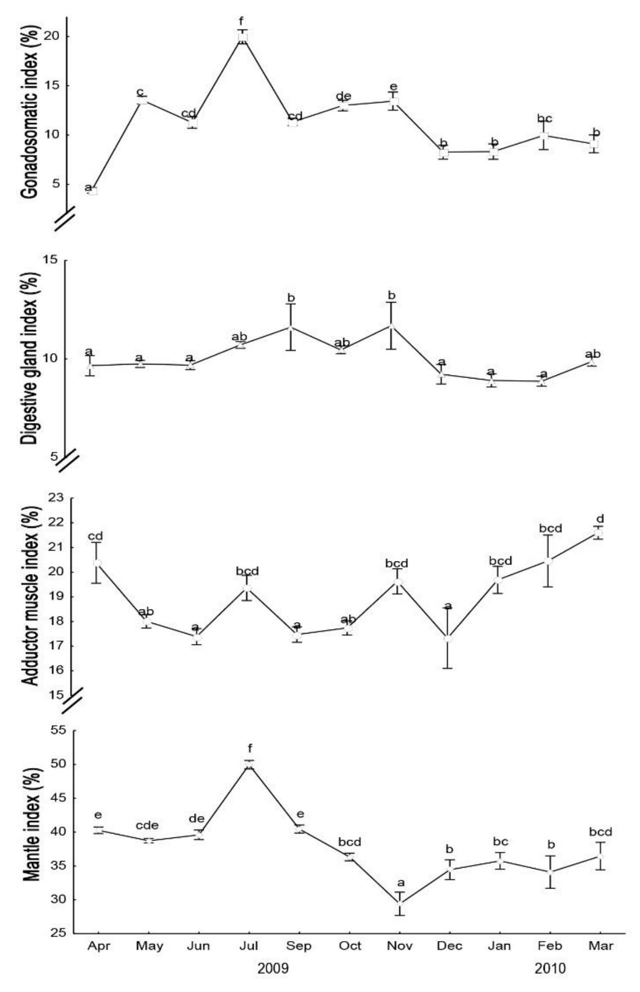


Figure 3. Mean monthly variations in the gonadosomatic index, digestive gland index, adductor muscle index, and mantle tissue index of lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culturing system in Bahía Tortugas, Mexico during the annual cycle April 2009-March 2010. Means sharing the same superscript denote lack of significantly differences ($P < 0.05$). Bars show the mean ± standard error.

genesis appears to be sustained by the energy taken from recently ingested food, following an opportunistic strategy. However, the DGI significant decreased and the AMI significantly increased during one of the two breeding peaks (January through March), suggesting that the species also uses some of its stored reserves to partially sustain gametogenesis (conservative strategy). Based on this evidence, we believe that *N. subnodosus* can adopt either an opportunistic or a conservative strategy to maximize reproductive output depending on prevailing environmental conditions in Bahía Tortugas.

In Laguna Ojo de Liebre, a temperate site close to the study area (Fig. 1), reproduction of wild *N. subnodosus* is seasonal; here, a short ripening and spawning period from September through November is followed by a large quiescent period from December onwards (Arellano-Martínez *et al.*, 2004, 2011). This seasonal pattern of reproduction in Laguna Ojo de Liebre is likely the result of low primary productivity limiting nutrient availability to filter feeders during most of the year (Lluch-Belda *et al.*, 2000). The scenario points towards the usage of a conservative strategy to manage energy reserves during narrow breeding peaks, which contrasts with the dynamic pattern of Bahía Magdalena (Racotta *et al.*, 2003), Bahía de Los Angeles (Yee-Duarte, 2009), and Bahía Tortugas (this study) as BAC areas (Morales-Zárate *et al.*, 2011).

The marked thermic oscillations registered in Bahía Tortugas during May-September 2009 appear to be anomalous and not representative of the area for a normal year not influenced by ENSO events. In this period, a large percentage of ripe gonads experienced a spawning interruption and a resorption process (atresia). Atresia has been well described in scallops (Benninger & Le Pennec, 2006), and usually indicates nutrient recycling as a result of stress originated from unsuitable conditions at the wild (Arellano-Martínez *et al.*, 2004, 2011) or within the culturing system because of overcrowding, presence of predators, lack of maintenance, etc. (Velasco *et al.*, 2009). In our study, it is likely that stress would originate only when atypical thermal oscillations occurred, since our overall evidence suggests that the culturing system set in Bahía Tortugas offers suitable conditions for a continuous reproduction of *N. subnodosus*. Based on this evidence, this scallop species may become a viable candidate for profitable cultivation in Bahía Tortugas and other BAC areas of the eastern or western coasts of the Baja California Peninsula. To achieve this, and optimize a protocol for successful cultivation of the species in these areas, we recommend analyzing certain aspects of its physiological response at the wild and under cultivation conditions, such as immune, antioxidant, and genetic. The plasticity of the species to use conservative or opportunistic strategy also needs to be validated as for the quality of gametes produced and overall performance of larvae and spat reared in hatcheries.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the following staff at CIBNOR: Horacio Bervera, Juan J. Ramírez, Enrique Calvillo, and Mario Cota for assistance during field collections; Carmen Rodríguez-Jaramillo and Eulalia Meza for support in processing of tissue samples; and Ira Fogel for editorial improvements. This research was funded through SIP 20101187 of Instituto Politécnico Nacional, and

CONACyT 2009-2010 and 81249 grants. MAAD is a fellow student of PIFI (IPN) and CONACyT, and the results presented here are part of his MSc Thesis.

REFERENCES

Arellano-Martínez, M., I.S. Racotta, B.P. Ceballos-Vázquez & J.F. Elorduy-Garay. 2004. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. J. Shellfish Res., 23: 15-23.

Arellano-Martínez, M., B.P. Ceballos-Vázquez, C. Ruiz-Verdugo, E. Pérez de León, R. Cervantes-Duarte & P.M. Domínguez-Valdéz. 2011. Growth and reproduction of the lion’s paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culture system at Guerrero Negro Lagoon, Baja California Sur, Mexico. Aquacult. Res., 42: 571-582.

Barber, B.J. & N.J. Blake. 2006. Reproductive physiology. In: S.E. Shumway & G.J. Parsons (eds.). Scallops: biology, ecology and aquaculture. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 357-416.

Benninger, P.G. & M. Le Pennec. 2006. Fundamental anatomy of scallops. In: S.E. Shumway & G.J. Parsons (eds.). Scallops: biology, ecology and aquaculture. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 123-228.

Lluch-Belda, D., J. Elourduy-Garay, S.E. Lluch-Cota & G. Ponce-Díaz. 2000. BAC, Centros de Actividad Biológica del Pacífico Mexicano. CIBNOR-CICIMAR-CONACYT. La Paz, B.C.S., México, 367 pp.

Morales-Zárate, M.V., S.E. Lluch-Cota, E. Serviere-Zaragoza & S. Guzmán del Proo. 2011. Modeling an exploited rocky coastal ecosystem: Bahía Tortugas, Mexico. Ecol. Model., 222: 1185-1191.

Received: 27 July 2014; Accepted: 24 March 2015

Ponce-Díaz, G., A. Massó-Rojas, E.F. Félix-Picó, M.V. Morales-Zárate, N. García, C.J. Lodeiros & S.E. Lluch-Cota. 2011. *Nodipecten* spp. como recurso pesquero. In: A.N. Maeda-Martínez & C.J. Lodeiros (eds.). Biología y cultivo de los pectínidos del género *Nodipecten*. Limusa, Mexico D.F., pp. 11-26.

Racotta, I.S., J.L. Ramírez, A.M. Ibarra, M.C. Rodríguez-Jaramillo, D. Carreño & E. Palacios. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. Aquaculture, 217: 335-349.

Rodríguez-Jaramillo, C., M.A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, E. Manzano & E. Palacios, 2008. Gonad development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. J. Shellfish Res., 27: 1-13.

Sokal, R. & J.H. Rohlf. 1995. Biometry. W.H. Freeman, New York, 937 pp.

Velasco, L.A., J. Barros & A. Guerrero. 2009. Effect of the density on the growth and survival of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus* in suspended culture. Aquacult. Res., 40: 687-695.

Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, M. Robles-Mungaray & B.P. Ceballos-Vázquez. 2004. Growth of lion-paw *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) maintained in suspended culture in Bahía de Juncalito, Golfo de California, Mexico. Hidrobiológica, 14: 1-5.

Yee-Duarte, J.A. 2009. Estrategia reproductiva de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835 en Bahía de Los Ángeles, B.C. México. M.Sc. Thesis, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del I.P.N., La Paz, B.C.S., 73 pp.